



**T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**CARFİLZOMİB DİRENÇLİ MULTİPL MİYELOM
HÜCRELERİNDE KANSER TESTİS
ANTİJENLERİNİN İFADELERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Yakuphan BAYKAN

BURDUR, 2022

**T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**CARFİLZOMİB DİRENÇLİ MULTİPL MİYELOM
HÜCRELERİNDE KANSER TESTİS
ANTİJENLERİNİN İFADELERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Yakuphan BAYKAN

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi DİLARA AKÇORA YILDIZ

BURDUR, 2022

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum **“Carfilzomib Dirençli Multipl Miyeloma Hücrelerinde Kansere Testis Antijenlerinin İfadelerinin Araştırılması”** başlıklı bu tezin;

- Kendi çalışmam olduğunu,
- Sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi,
- Bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi,
- Kullandığım verilerde değişiklik yapmadığımı,
- Tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı,
- Bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı,

bildirir, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

27 / 07 / 2022

(İmza)

Yakuphan BAYKAN

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan değerli Danışman Hocam Dr. Öğr. Üyesi Dilara AKÇORA YILDIZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Uzm. Orhan YAVUZ'a ve Uzm. Ali Kıyak'a

Eğitim hayatımın her aşamasında beni her anlamda destekleyen anneme ve baba'ma
Araştırmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm laboratuvar arkadaşlarım Çağlar ARKAN ve Gamze BOZKAYA'ya

Çalışmalarım sırasında beni her anlamda destekleyen Nagehan Gül'e teşekkür ederim.

0660-YL-20 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Eğitim hayatımın her aşamasında beni her anlamda destekleyen aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Temmuz, 2022

Yakuphan BAYKAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL DİZİNİ	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÖZET	viii
SUMMARY	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Multipl Miyelom	3
2.2. Ubikitin-Proteazom Sistemi	5
2.3. Proteazom İnhibitörleri (PI)	6
2.3.1. Bortezomib (BTZ)	7
2.3.2. Carfilzomib (CFZ)	7
2.4. MM’da PI Direnci	8
2.5. Kanseri-Testis Antijenleri	10
2.5.1. Kanseri-Testis Antijenleri ve Spermatogenez	11
2.5.2. Kanseri-Testis Antijenlerinin Düzenlenmesi	12
2.5.3. Kanseri-Testis Antijenlerinin Kanseri Hücrelerindeki Rolü	12
2.5.4. CTA’ların İşlevleri	14
2.6. MM’da CTA	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM	16
3.1. MM Hücrelerinin Kültürü	16
3.2. CFZ Dirençli MM Hücre Serilerinin Oluşturulması	16
3.2.1. MTT Analizi	16
3.2.2. CFZ Dirençli MM Hücre Serilerinin Oluşturulması	17
3.3. RNA İzolasyonu ve qPCR Çalışmaları	18
3.3.1. RNA İzolasyonu ve Kantitasyonu	18
3.3.2. cDNA Sentezi	18
3.3.3. Kantitatif Eş-Zamanlı PCR ve İstatistiksel analiz	18
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	22
4.1. CFZ Dirençli Hücrelerin Oluşturulması	22
4.1.2 CFZ Dirençli Hücrelerde Direnç Katsayısının ve MDR1 Gen Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi	23
4.2. CFZ Dirençli MM Hücrelerinde CTA Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	25
4.2.1. MAGE-C1 Geninin Ekspresyon Düzeyi	26
4.2.2. MAGE-C2 Geninin Ekspresyon Düzeyi	26
4.2.3. MAGE-A3 Geninin Ekspresyon Düzeyi	28
4.2.4. COX6B2 Geninin Ekspresyon Düzeyi	29
4.2.5. KIAA0100 Geninin Ekspresyon Düzeyi	31
4.2.6. LDH-C4 Geninin Ekspresyon Düzeyi	31
4.2.7. SPATA19 Geninin Ekspresyon Düzeyi	33
5. SONUÇ	39
KAYNAKLAR	40

EKLER	49
-------------	----



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1 MM başlaması ve ilerlemesi (Dutta vd., 2017).....	4
Şekil 2.2 UPS sistemi (Bachiller vd., 2020).....	5
Şekil 2.3. BZT'in moleküler yapısı	7
Şekil 2.4.CZF'in moleküler yapısı	8
Şekil 3.1. MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-A3, LDH-C4, COX6B2, FATE1, KIAA0100 ve HPRT primerlerinin Gradient PCR ile Tm derecelerinin tayin edilmesi	20
Şekil 4.1. CFZ hassas ve CFZ dirençli RPMI 8226 hücrelerinde artan CFZ konsantrasyonlarına karşı azalan hücre canlılığı	22
Şekil 4.2. CFZ hassas ve CFZ dirençli U266 hücrelerinde artan CFZ konsantrasyonlarına karşı azalan hücre canlılığı	23
Şekil 4.3.CFZ hassas ve CFZ dirençli RPMI 8226 hücrelerinde CFZ IC50 oranlarının karşılaştırılması.....	24
Şekil 4.4.CFZ hassas ve CFZ dirençli U266 hücrelerinde CFZ IC50 oranlarının karşılaştırılması.....	24
Şekil 4.5.CFZ hassas ve dirençli RPMI 8226 hücrelerinde MDR1 mRNA kat değişimi ...	25
Şekil 4.6.CFZ hassas ve dirençli U266 hücrelerinde MDR1 mRNA kat artışı.....	25
Şekil 4.7. CFZ hassas ve CFZ dirençli RPMI 8226 hücrelerinde MAGE-C1gen ekspresyon düzeyindeki kat azalışı.....	26
Şekil 4.8. CFZ hassas ve CFZ dirençli U266 hücrelerinde MAGE-C2gen ekspresyon düzeyindeki kat azalışı.....	27
Şekil 4.9. CFZ hassas ve CFZ dirençli RPMI 8226 hücrelerinde MAGE-C2 gen ekspresyon düzeyindeki kat azalışı.....	27
Şekil 4.10. CFZ hassas ve CFZ dirençli U266 hücrelerinde MAGE-A3 gen ekspresyon düzeyindeki kat azalışı.....	28
Şekil 4.11. CFZ hassas ve CFZ dirençli U266 hücrelerinde COX6B2 gen ekspresyon düzeyindeki kat azalışı.....	30
Şekil 4.12. CFZ hassas ve CFZ dirençli RPMI 8226 hücrelerinde COX6B2 gen ekspresyon düzeyindeki kat azalışı.....	30
Şekil 4.13. CFZ hassas ve CFZ dirençli RPMI 8226 hücrelerinde KIAA0100 gen ekspresyon düzeyindeki kat azalışı.....	31
Şekil 4.14. CFZ hassas ve CFZ dirençli U266 hücrelerinde LDH-C4 gen ekspresyon düzeyindeki kat azalışı.....	32

Şekil 4.15. CFZ hassas ve CFZ dirençli RPMI 8226 hücrelerinde LDH-C4 gen ekspresyon düzeyindeki kat azalışı.....	32
Şekil 4.16. CFZ hassas ve CFZ dirençli U266 hücrelerinde SPATA19 gen ekspresyon düzeyindeki kat azalışı.....	33



ÇİZELGE DİZİNİ

Tablo 3.1. CFZ ile muamele edilen RPMI 8226 ve U266 hücrelerinde inhibitör konsantrasyon (IC) değerleri	17
Tablo 3.2. İlgili genlere özgü tasarlanan primerlerin dizileri, uzunluk ve Tm değer bilgileri	21



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat
µL	: Mikrolitre
BTZ	: Bortezomib
cDNA	: Komplementer DNA
CFZ	: Karfilzomib
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
Dnaz	: Deoksiribonükleaz
FBS	: Fetal Bovine Serum
HPRT	: Hipoksantin Guanin Fosforibozil Transferaz
MGUS	: Önemi Belirsiz Plazma Hücre Monoklonal Gamopati
MM	: Multipl Miyelom
mRNA	: Mesajcı RNA
MTT	: 2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
nM	: nanoMolar
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
q-PCR	: Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribo Nükleik asit
RNAi	: RNA interferaz
Rnaz	: Ribonükleaz
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RT-PCR	: Reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
SMM	: Smoldering multiple miyelom
Ub	: Ubikitin
UPS	: Ubikitin Proteaz Sistemi
RPMI 1640	: Roswell Park Memorial Institute 1640

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Carfilzomib Dirençli Multipl Miyelom Hücrelerinde Kansere Testis Antijenlerinin İfadelerinin Araştırılması

Yakuphan BAYKAN

**Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Dilara AKÇORA YILDIZ

Temmuz, 2022

Multipl miyelom (MM), kemik iliğinde aşırı miktarda tek tip antikor üreten anormal plazma hücrelerinin proliferasyonu sonucu oluşan ve klinik anemi, böbrek yetmezliği, kemik yıkımı ve hiperkalsemi bulgularının varlığı ile karakterize edilen en yaygın ikinci hematolojik kanser tipidir. Son yıllarda tedavisindeki çarpıcı gelişmelere rağmen çoğu hastanın kaçınılmaz bir şekilde relaps ve mevcut tedavilere dirençli hale gelmesinden (refrakter) dolayı MM hâlâ öldürücü maligniteler arasında yer almaktadır. MM’da proteazom inhibisyonu, hücre içi proteinlerin birikip hücrenin ölümüne sebep olmasından dolayı ilk nesil PI’ü Bortezomib (BTZ) MM hastalarının sağ kalım sürelerini iyileştirmede devrim yaratmıştır. İkinci nesil PI’ü Karfilzomib (CFZ), klinikte BTZ dirençli hastalarda oluşan direncin üstesinden gelerek ölüm riskinde önemli bir azalma sağlamaktadır. Ancak, relaps/refrakter hastaların tedavi rejimlerinde kullanılan CFZ’e karşı gelişen direncin üstesinden gelebilmek için MM’da maligniteyi yönlendiren moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Kanser/Testis Antijenleri (CTA’lar), fizyolojik koşullar altında ekspresyonu testis ile sınırlı olan ancak birçok kanser çeşitlerinde ekspresyonu artan bir protein grubu olmalarından dolayı immünoterapi için çekici hedeflerdir. MM hücre hatları ve MM hastalarından elde edilen primer hücrelerde farklı CTA’ların farklı seviyede ekspresyon edildikleri tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, ilk defa iki farklı CFZ dirençli MM hücre hattında CTA ailesi üyelerinden MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-A3, COX6B2, KIAA0100, LDH-C4, ve SPATA19’un mRNA ifade seviyeleri kantitatif PCR (qPCR) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. qPCR sonuçları, ilgili genlerin mRNA ekspresyon seviyelerinin CFZ hassas RPMI 8226 ve U266 hücrelerine kıyasla CFZ dirençli hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: multipl miyelom, kanser-testis antijenleri, ilaç direnci, Carfilzomib direnci, mRNA

Hazırlanan bu Yüksek Lisans tezi Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0660-YL-20 proje numarası ile desteklenmiştir.

SUMMARY

M. Sc. Thesis

Investigation of Expression of Cancer Testis Antigens in Carfilzomib-Resistant Multiple Myeloma Cells

Yakuphan BAYKAN

**Burdur Mehmet Akif Ersoy University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology**

Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Dilara AKÇORA YILDIZ

July, 2022

Multiple myeloma (MM) is the second most common hematological cancer that results from the proliferation of abnormal plasma cells producing excessive amounts of one type of antibody in the bone marrow and is characterized by the presence of clinical symptoms of anemia, renal failure, bone destruction, and hypercalcemia. Despite the dramatic improvements in the treatment of MM in recent years, MM is still among the lethal malignancies, as most patients inevitably relapse and become refractory to current therapies. As proteasome inhibition in MM leads to the accumulation of intracellular proteins to cause cell death, the first generation PI, Bortezomib, has revolutionized the survival of MM patients. The second generation PI, Carfilzomib (CFZ), significantly reduces the risk of death by overcoming the resistance in clinically BTZ resistant patients. However, a better understanding of the molecular mechanisms driving malignancy in MM is needed to overcome the resistance to CFZ used in the treatment regimens of relapsed/refractory patients.

Cancer/Testicular Antigens (CTAs) are attractive targets for immunotherapy as they are a group of proteins whose expression is limited to the testis under physiological conditions but increased in many types of cancer. It was determined that different CTAs were expressed at different levels in MM cell lines and primary cells obtained from MM patients. In this study, mRNA expression levels of CTA family members MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-A3, COX6B2, KIAA0100, LDH-C4, and SPATA19 were determined for the first time in two different CFZ-resistant MM cell lines using quantitative PCR (qPCR) method. qPCR results show that the mRNA expression levels of the genes involved are significantly reduced in CFZ-resistant cells compared to CFZ-sensitive RPMI 8226 and U266 cells. As a result, it has been seen that the mechanisms that play a role in determining the levels of the relevant CTA proteins in CFZ-resistant MM cells and their stabilization at the post-translational level need to be studied in detail.

Keywords: multiple myeloma, carfilzomib resistance, cancer/testis antigens, mRNA



1. GİRİŞ

Multipl miyelom (MM), lenfomadan sonra en yaygın ikinci kan kanseri olup, klonal plazma hücrelerinin kemik iliğinde artan proliferasyonu ve hastaya ait serumda veya idrar örneğinde fazla sayıda M proteini olarak bilinen monoklonal immünoglobulinin (Ig) tespiti ile karakterizedir (Saltarella vd., 2015). MM komplikasyonları arasında kemik lezyonları, hiperkalsemi, böbrek yetmezliği, sitopeniler ve immün baskılanma yer alır. MM tedavisi, birçok yeni anti miyelom ilacının ortaya çıkmasıyla son yirmi yılda önemli ölçüde iyileşmiş, ortalama yaşam süresini üç ila dört yıldan yedi ila sekiz yıla çıkarmıştır. MM, tedavisindeki gelişmelere rağmen hastalarda tedavide kullanılan ilaçlara karşı direncin gelişmesi nedeniyle MM tam tedavisi olmayan hastalık olarak kabul edilmektedir (Colombo vd., 2015).

MM hücrelerinin aşırı miktarda tek tip antikor üretip salgılamalarından dolayı protein kalite kontrol kapasiteleri artmıştır. Hücre içi protein kalite kontrolünün sağlanmasında, proteinlerin parçalanmasından veya işlenmesinden sorumlu olan proteazom, çok enzimli bir katalitik komplekstir (Berenson vd., 2014). Proteazom tüm hücrel metabolik süreçlerin düzenlenmesinde yer alan ana katabolik bir yol olan ubiquitin proteazom sisteminin (UPS) merkezi proteolitik düzeneğidir.

Proteazom aktivite düzensizliğinin tümör baskılayıcılar ve onkoproteinler arasındaki dengeyi bozarak karsinogenezi ve kanser ilerlemesini teşvik ettiği iyi bilinmektedir. Bu nedenle, “proteotoksik kriz” hipotezine uygun olarak, proteazom, anti-neoplastik ilaçlar için etkili bir hedef olarak artan bir ilgi kazanmıştır (Abraham vd., 2015). Nitekim, şu anda MM tedavisi için onaylanmış üç proteazom inhibitörü (PI) mevcuttur. Birinci nesil PI, Bortezomib (BTZ), ikinci nesil Karfilzomib (CFZ) ve ilk oral PI olan, İlkazomib'dir (Sherman ve Li, 2020). BTZ, 20S'in kimotripsin benzeri aktivitesinin tersine çevrilebilir bir inhibitörüdür ve MM tedavisinde devrim yaratarak hastaların hayatta kalma oranlarının iyileşmesine yol açmıştır. CFZ, intravenöz olarak uygulanan ikinci nesil bir tetrapeptid epoksiketon proteazom inhibitörüdür. CFZ, 26S proteazomu içindeki proteolitik çekirdek parçacık olan 20S proteazomunun N-terminal treonin içeren aktif bölgelerine geri dönüşümsüz olarak bağlanır. CFZ, 2012 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde ve 2015 yılında Avrupa'da relaps/refrakter MM (RRMM) hastaların tedavi rejimlerine dâhil edilmiştir.

Kanser/testis antijenleri (CTA), ekspresyonları testislerdeki erkek germ hücreleriyle sınırlı olan ve yetişkin somatik dokularında bulunmayan bir grup tümör antijenini temsil etmektedir (Kulkarni ve Uversky, 2017). CTA'nin ortak özellikleri arasında çok genli bir aile olarak bulunmaları, dokuya özgü ekspresyon profillerine sahip olmaları, çoğunlukla X kromozomunda yer almaları ve ekspresyonlarının hipometilasyon ve histon asetilasyonu ile regüle edilebilmesi yer almaktadır (Hashimoto vd., 2022). Günümüze kadar, dizi homolojisine göre 250'den fazla insan CTA geni bulunduğu ve 70 aileye gruplanmış oldukları belirtilmektedir. CTA'lar, sırasıyla X kromozomu veya otozomlar üzerinde bulunmalarına bağlı olarak CT-X antijenleri ve X olmayan CTA olarak geniş bir şekilde kategorize edilebilir. X kromozomundaki genlerin %10'dan fazlasının CTA genleri olduğu gösterilmiştir. Melanomla ilişkili antijen (MAGE) ailesi, toplam 60 CTA geni içeren en büyük CTA ailesidir ve MAGE-A, -B, -C ve -D alt ailelerinden oluşmaktadır. MAGE genlerinin tümü, X kromozomunda bulunur. Mide Kanseri hücrelerinde MAGE-A3'ün, ilaç direncini ve proliferasyonu artırdığı gösterilmiştir (Yang vd., 2022). Ayrıca glioblastom U937 hücrelerinde KIAA0100 geninin aşağı regülasyonunun apoptotik hücrelerin yüzdesini arttırdığı rapor edilmiştir (Cui vd., 2017). COX6B2, SPATA19 ve KIAA0100 mitokondri metabolizması üzerinde etkili üç CTA genidir (Aurrière vd., 2021). COX6B2 mitokondriyal elektron taşıma zincirinin kompleks IV'ünün testise özgü bir alt birimidir. MM hücrelerinde LDHA'nın önemli ölçüde arttığını, ancak LDHB ve LDHC için bir fark olmadığını bildirilmiştir. MM hücrelerinde LDH-C4'ün artan ifade seviyesi, azalan sağ kalım oranı ve kötü prognoz riskinin artmasıyla önemli ölçüde ilişkili olduğu bildirilmiştir (Gupta, 2012).

Genel olarak, onkojenik CTA'lar tümör büyümesini, metastazı, ilaç direncini teşvik eder ve çeşitli kanser hastalarında kötü prognozla yakından ilişkilidir. Bu nedenle, onkojenik CTA'lar kanser tedavisi için potansiyel hedef olarak kabul edilmektedirler (Yang vd., 2021).

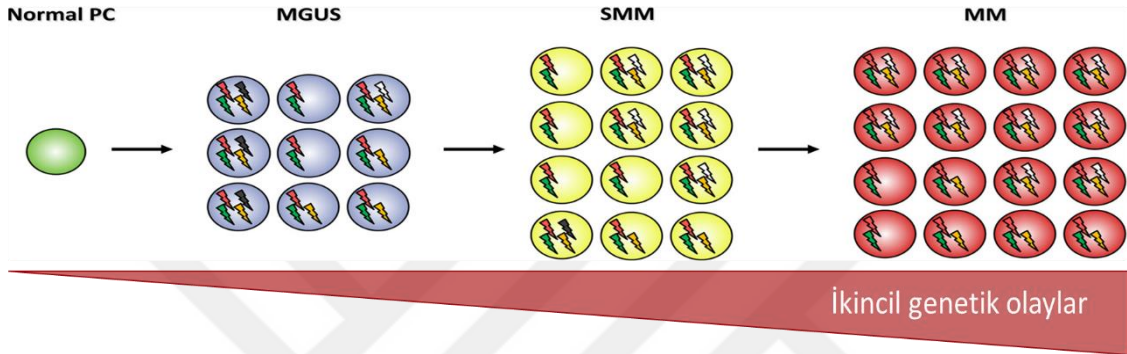
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Multipl Miyelom

Multipl Miyelom (MM), tek tip monoklonal antikor (M proteini veya paraprotein olarak da bilinir) salgılayan plazma hücrelerinin kemik iliğinde artan proliferasyonu ile karakterize heterojen bir neoplazmdır (Cardona-benavides vd., 2021). Normal fizyolojik koşullar altında, plazma hücreleri kemik iliğinde bulunan ve hümmoral bağışıklığı korumak için gerekli olan olgun antikor üreten B hücreleridir (Morgan vd., 2012). MM hücrelerini normalde bölünmeyen sağlıklı plazma hücrelerinden ayıran en önemli özellik ise MM plazma hücrelerinin proliferasyon yeteneğidir (Prideaux vd., 2014). Bu hastalıkta, aşırı çoğalan, vücudu enfeksiyonlara karşı koruyamayan plazma hücreleri diğer kan hücre tiplerinin çoğalmasını baskılar. Böylece platelet, eritrosit ve beyaz kan hücre oluşumunun eksikliğine yol açarak, kanamaların ve yaralanmaların artmasına, ayrıca vücudun enfeksiyonlara karşı korunmasız kalmasına neden olur. İlâveten, bu hastalıkta kemik iliğinde biriken malign plazma hücreleri vücuda üç şekilde zarar vermektedir. Bunlardan ilki antikorların birikmesinden dolayı böbreklere zarar vermesi, ikincisi kemiğin fiziksel yapısının bozulması ile osteolitik lezyonların görülmesi, sonuncusu ise MM hücrelerinin sitokinler ve büyüme faktörlerini salgılaması sonucu MM gelişimi ve ilerlemesine katkıda bulunmasıdır (Saltarella vd., 2015). Nitekim, MM'da hiperkalsemi, böbrek hasarı, anemi ve kemik lezyonları "CRAB" semptomları olarak bilinmektedir ve bu semptomlar uç organ hasarına neden olmaktadır (Padala vd., 2021). MM hastalık progresyonunda malign gelişimi tetikleyen başlatıcı olay ya hiperdiploidi edinimi ya da immünoglobulin ağır zincir gen lokusunu içeren bir translokasyondur. Bu tür klonal olaylar MM oluşmadan öncül aşamalardan belirsiz öneme sahip monoklonal gammopati (MGUS) ve sessiz-sinsi MM (SMM)'da mevcuttur.

MGUS'da monoklonal protein veya M proteini miktarı 30 g/L'nin altında olup, klonal kemik iliği plazma hücre oranı %10'un altındadır. Bir sonraki aşama olan SMM'de ise M proteini miktarı 30 g/L'nin üstündedir ve klonal kemik iliği plazma hücre oranı %10'dan fazladır (Nijhof vd., 2015). Hem MGUS hem de SMM'de yavaş büyüyen miyeloma hücreleri bulunmakta olup CRAB semptomları bulunmamaktadır. SMM'dan sonraki evre ise tedavi gerektiren aktif MM'dur (Şekil 2.1). MM gelişimi sırasında, malign hücreler kemik iliği mikro çevresi tarafından desteklenir. Bu mikro çevre tümör gelişimini, migrasyonu, diferansiasyonu, ilaç direncini ve anjiyogenezi uyarmaktadır. Kemik iliği mikro çevresi ekstraselüler matriks proteinleri ve çeşitli stromal hücreler içerir (Saltarella

vd., 2015). Syndecan-1 (CD138) kemik iliği mikro çevresindeki bazı metabolik olayları düzenleyen ve dolayısıyla kanser oluşumunu ve gelişimini destekleyen bir yüzey belirteçidir. Heparan sülfat proteoglikan yapısında olan bu belirteç sayesinde birçok çalışmada miyelom hücrelerinin izole edilmesi CD138'in hedeflenmesi ile gerçekleşmiştir (Bayer-Garner vd., 2001). CD138'in, B lenfositlerde ifade edilmediği fakat plazma hücrelerinde diferansiasyon sırasında görüldüğü literatürde yer almaktadır (Palumbo vd., 2015).



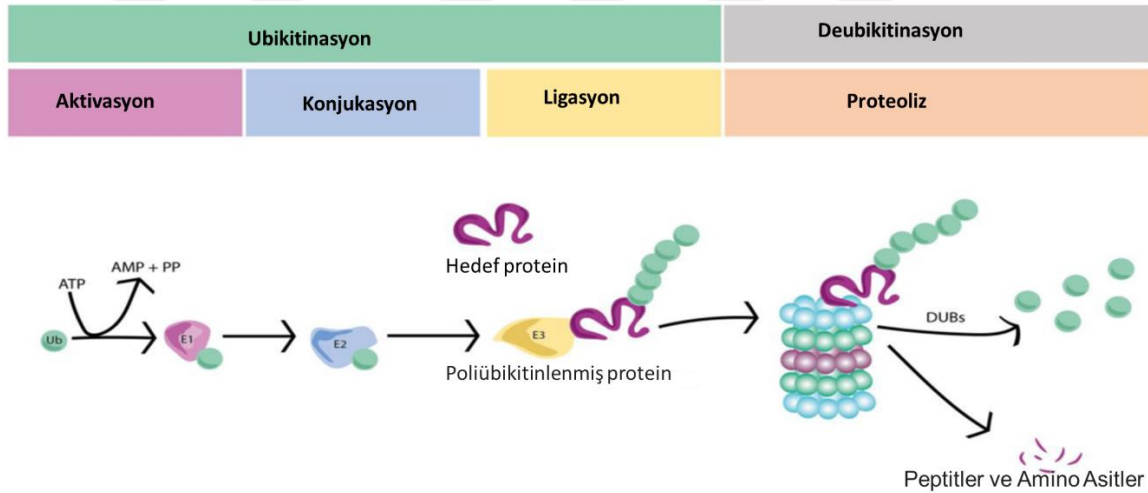
Şekil 2.1 MM başlaması ve ilerlemesi (Dutta vd., 2017)

MM'a yol açan başlıca genetik olaylar; kalıtsal varyasyon, translokasyon, kopya sayısı anormallikleri ve mutasyonlardır. Bu tür olayların net biyolojik etkileri hücrenin davranışını değiştirerek miyelomun temel moleküler özelliklerini ortaya çıkarmaktadır (Pawlyn ve Morgan, 2017). MM gelişimi ile ilişkili birincil genetik olaylar, hiperdiploid olmayan ve hiperdiploid gruba ayrılabilir; her ikisi de tek tip olarak siklin D genlerinin bozulmasıyla sonuçlanır (Bloedjes vd., 2021). Hiperdiploid olmayan defektler MGUS hastalarının yaklaşık %45'inde ve tüm MM hastalarının %40-50'sinde gözlenir (Morgan vd., 2012). Bunlar esas olarak immünoglobulin ağır zincir (IgH) lokusunu (14q32) içeren translokasyonları içermektedir. Birincil genetik olaylar t(4;14), t(6;14), t(11;14), t(14;16) ve t(14;20) translokasyonları MMSET/FGFR3, CCND3, CCND1, MAF ve MAFB onkogenlerin aşırı ekspresyonuna neden olur. En sık translokasyon t(11;14), (q13;q32)'dir ve siklin D1 geninin anormal ifadesine neden olur (Maes vd., 2017). MM'da görülen diğer genetik anormallik sınıfı, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 ve 21 dâhil olmak üzere tek sayılı kromozomların kazanımı ile ilişkili olan hiperdiploididir (Pawlyn ve Morgan, 2017). MGUS hastalarının %50'sinde ve MM hastalarının %55'e kadarında hiperdiploidi gözlenmektedir (Maes vd., 2017).

2.2. Ubikitin-Proteazom Sistemi

Translasyondan sonra çoğu protein, aktivitelerini modüle etmek için fosforilasyon, asetilasyon, metilasyon, glikozilasyon ve ubikitinasyon gibi çeşitli modifikasyonlara uğramaktadır (Young vd., 2019). Ubikitin-proteazom sistemi (UPS), tüm ökaryotik hücrelerde protein bozulmasını kontrol eden başlıca proteolitik sistemdir (Kitajima vd., 2018). UPS, DNA onarımı, stres yanıtı ve hücre çoğalması gibi birçok hücresel sürecin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Park vd., 2020).

UPS genellikle iki ayrı moleküler mekanizma grubu olarak temsil edilir. Birinci grup, ubikitin ailesinin tek bir üyesi ile protein substratlarını modifiye etmek/değiştirmek için hareket eden spesifik enzimleri ve kofaktörleri içerir. UPS'nin ikinci grubu, ubikitin etiketli substratların proteolizinden sorumlu olan yaklaşık 2.000 kDa'lık 26S proteazomudur (Mata-Cantero vd., 2015).



Şekil 2.2 UPS sistemi (Bachiller vd., 2020)

Ub konjugasyonu veya ubikitinasyon, bir (monoubikitinasyon) veya birkaç (poliübikitinasyon) Ub molekülünün bir proteine kovalent olarak bağlanmasından oluşan ve üç tip enzimin uyumlu, ardışık etkisine bağlı olan translasyon sonrası bir modifikasyondur (Young vd., 2019). Ub, tüm ökaryotlarda büyük ölçüde evrimsel olarak korunan 76 amino asit kalıntısından oluşan bir proteindir (Al Mamun vd., 2020). Ubikitinasyon işlemi, aktive edici (E1), konjuge edici (E2) ve ligasyon (E3) enzimleri olarak bilinen üç enzim ile ilgili ardışık üç aşamada yer alır. Proteinlerin UPS tarafından parçalanması, protein substratına Ub konjugasyonunun ilk adımını, ardından deubikitinleştirici enzimlerin aracılık ettiği Ub'nin serbest bırakılmasıyla, 26S proteazom kompleksi poliübikitinlenmiş proteinin

bozunmasını içeren sıralı bir işlemdir (Leonardo-sousa vd., 2022). Ayrıca, 26S proteazomu, Ub-konjuge proteinlerin parçalanmasında çok önemli bir rol oynayan büyük bir çoklu alt birim kompleksidir.

Ubikitinasyon işleminde, ubikitin (Ub) C-terminal kalıntılarında bulunan E1 ve ubikitin arasında bir tiyol-ester bağı oluşumu tarafından katalize edilen glisin karboksil grubunun aktivasyonu ATP'nin hidrolizi ile gerçekleşir. AMP ve bir PPI molekülünün salınımı ile aktive edilmiş ubikitin trans-açılasyon yoluyla E2 enziminin tiyol grubuna transfer edilir (Kohlmann vd., 2013). Daha sonra E3, parçalanacak olan proteini tanıyarak ve ubikitin C-terminal glisin kalıntıları ile proteinin bir lizin kalıntısı arasında bir izopeptid kovalent bağ oluşumu ile E2'nin ubikitini proteine transfer etmesini kolaylaştırır (Leonardo-sousa vd., 2022). Daha sonra, substrat üzerinde bir poliübikitin zinciri oluşturmak için çoklu ubikitinasyon döngüleri gerçekleşir ve poliübikitletmiş proteinler 26S proteazomu tarafından tanınır ve parçalanır (Park vd., 2020) (Şekil 2.2.).

2.3. Proteazom İnhibitörleri (PI)

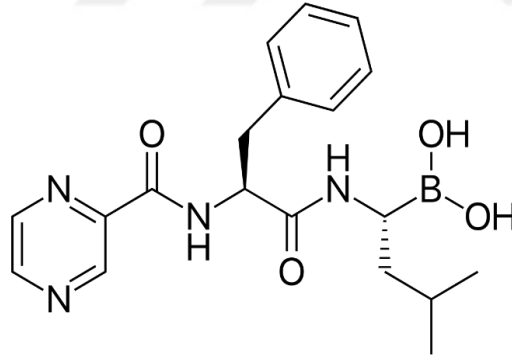
Proteazom, 20S çekirdek partikülü (CP) ve bir veya iki 19S düzenleyici partikülden (RP) oluşan, proteini peptidlere hidrolize etmekten sorumlu ATP'ye bağlı çok alt birimli bir komplekstir (Aurrière vd., 2021; Sherman ve Li, 2020). 20S CP, aktif katalitik bölgeler içeren ve proteolizin meydana geldiği fiçı şeklinde bir proteolitik çekirdektir. 19S RP'ler ise deubikitinasyona aracılık ederek ubikitin proteinleri 20S CP'ye seçici ve etkili bir şekilde aktarmada rol oynar. 20S CP, merkezi bir boşluk etrafında heptamerik halkadan (7α , 7β , 7β ve 7α) oluşur. (Park vd., 2020; Wang vd., 2021). 19S RP'oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir 19 stokiyometrik alt birimi vardır. Ubikitinlenmiş proteinler, 19S RP'deki spesifik reseptörler tarafından yakalanır ve daha sonra proteazomla ilişkili de-ubikitinasyon enzimleri (DUB) tarafından deubikitinlenir. 19S RP'nin tabanındaki altı farklı ATPaz alt birimi, proteazom kanalının açılması için enerji sağlar (Park vd., 2020a).

Proteazom inhibisyonu hücreye toksik etki gösterdiğinden, hızla çoğalan ve anormal hücre döngüsü kontrol noktası düzenlemesine sahip olan neoplastik hücrelerin tedavisinde PI'nin kullanılmasının ilk gerekçesiydi (Manasanch ve Orlowski, 2017). Nitekim, MM hücrelerinin proteaz mekanizmalarına yüksek bağımlılığı ve aşırı bir salgı yüküne sahip olmalarından dolayı hematolojik kanserlerin tedavisinde özellikle PI'nin kullanılması etkilidir. İlk proteazom inhibitörü BTZ, 2003 yılında RR MM'nin tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır. UPS'in bileşenleri arasında proteazomu hedefleyen antikanser ilaçlarının geliştirilmesi en aktif araştırma alanıdır. Şimdiye kadar geliştirilen

proteazom inhibitörlerinin tümü, proteazomun 19S RP'sinin β -alt birimine bağlanarak proteolitik aktiviteyi inhibe etmede rol oynar (Park vd., 2020).

2.3.1. Bortezomib (BTZ)

Bortezomib, MM tedavisinde kullanılan ilk PI olup boronik asit içeren bir dipeptittir. BTZ, 19S RP'nin β 5 alt ünitesine bağlanıp onun kimotripsin benzeri enzimatik aktivitesini inhibe eden ve böylece poliübikitlene proteinlerin birikmesine yol açan 26S proteazomun geri dönüşümlü bir inhibitörüdür (Wu vd., 2016) (Şekil 2.3.). 26S proteazomunun BTZ tarafından geçici inhibisyonu, kaspaz-8/9 aktivasyonu ile miyelom hücrelerinin apoptozisine neden olur (Qiang vd., 2016). BTZ şu anda MM, relaps hücreli lenfoma, diffüz büyük B hücreli lenfoma, kolorektal kanser ve tiroid karsinomu dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır. BTZ doz sınırlayıcı toksititeye sahiptir bu da; ağrı, yorgunluk, periferik nöropati, miyelosupresyon ve kardiyotoksisite dahil olmak üzere birçok yan etkiye neden olduğu bildirilmiştir (Park vd., 2020b; Sherman ve Li, 2020). BTZ ile tedavi edilen hastaların yaklaşık %60'ı ilaca direnç geliştirmektedir. BTZ direncinin üstesinden gelmek için FDA, klinik çalışmalarda Doksorubisin, Adriamisin ve Deksametazon gibi kemoterapötik ajanlarla kombinasyon halinde BTZ kullanımını onaylamıştır (Park vd., 2020).

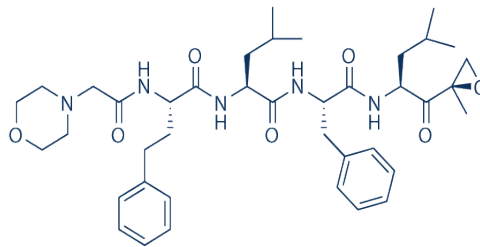


Şekil 2.3. BZT'in moleküler yapısı

2.3.2. Carfilzomib (CFZ)

Carfilzomib bir epoksiketon peptididir ve BTZ'ye direnç gösteren MM hastalarının tedavisi için 2012 yılında FDA tarafından onaylanan ikinci proteazom inhibitörüdür (Berenson vd., 2014) (Şekil 2.4.). CFZ, ağırlıklı olarak β 5 olmak üzere katalitik alt birimlerle kovalent ve geri dönüşümsüz bir bağ oluşturarak proteazomun kimotripsin benzeri aktivitesini BTZ'den daha güçlü bir şekilde inhibe eder. Ayrıca, daha seçici bir etki mekanizmasına ve yüksek kimyasal stabiliteye sahiptir, bu da BTZ'e kıyasla daha az yan etkiye neden olur (Soriano vd., 2016). Ancak, CFZ suda iyi çözünmediğinden oral olarak

uygulanamaz ve intravenöz enjeksiyon formülasyonları için büyük miktarda siklodekstrin gerekir (Park vd., 2020).



Şekil 2.4.CZF'in moleküler yapısı

2.4. MM'da PI Direnci

MM hastalarının çoğu başlangıçta anti-miyelom tedavisine yanıt vermektedir. Ancak, tedavinin ilerleyen safhalarında anti-miyelom tedavilerine dirençli hale gelirler(Davis ve Sherbenou, 2021). MM, genetik, epigenetik ve kromozomal değişikliklerle ilgili çok yönlü bir hastalıktır. MM’da PI direncinin altında yatan mekanizmalar belirsizliğini korumaktadır (Brünnert vd., 2019). PI direncinin altında yatan çok faktörlü mekanizmalar bulunmaktadır. Bu mekanizmalar genetik mutasyonlar, kromozomal instabilite, kopya sayısı anomalileri ve kemik iliği mikroçevresi ile ilişkilidir (Xu vd., 2019).

Protein dönüşümünün yaklaşık %90'ı ubiquitin-proteazom sistemi yoluyla gerçekleşir (Lecker vd., 2006). MM hücreleri oldukça yüksek miktarda antikör salgıladıklarından yanlış katlanmış veya kümelenmiş proteinleri proteazomal bozunma yoluyla imha etme yetenekleri gelişmiştir. Normal plazma ve miyelom hücreleri, uygun protein katlanmasını ve dönüşümünü sağlamak için katlanmamış protein yanıtına (UPR) büyük ölçüde bağımlıdır (Park vd., 2020).

BTZ direncinin üstesinden gelmek için , uzun süreli 20S CP inhibisyonu daha az dirençli bir antitümör yanıtı indükleyeceğinden daha az çapraz direnç gösteren, CFZ gibi geri dönüşü olmayan inhibitörler kullanılmıştır (Levin vd., 2016). BTZ tedavisi almış, nükseden ve/veya refrakter MM'li hastalarda Carfilzomibin inhibitör aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Kumar vd., 2012).

BTZ ve CFZ arasında paylaşılan bağlanma bölgesine dayanarak, $\beta 5$ alt birimindeki PSMB5 mutasyonlarının PI direnci için bir nokta olduğu tahmin edilmiştir. BTZ ile uyarlanmış MM hücre hatları $\beta 5$ alt birimindeki PSMB5’de mutasyonlar olduğu bildirilmiştir (Barrio vd., 2019). MM hasta örneklerinde, proteazom mutasyonları, Barrio ve meslektaşları tarafından kapsamlı bir şekilde karakterize edilmiştir. PSMB5'teki mutasyonlar, yeni teşhis edilen hastalarda %0.08 ile karşılaştırıldığında, nüks eden hastalarda %1,1 sıklıkta meydana gelmiştir (Barrio vd., 2019). Katalitik çekirdeğin dışındaki mutasyonlar ayrıca 20S alt birim genleri PSMA1, PSMB8 ve PSMB9, 19S alt birim geni PSMD1 proteazom düzeneği şaperon PSMG2'de düşük frekanslarda meydana gelir, ancak bunların işlevsel sonuçları bilinmemektedir (Kortüm vd., 2016). Proteazom aşırı ekspresyonunun BTZ direncine aracılık edebileceği varsayılırken, BTZ dirençli primer MM üzerine yapılan bir çalışma, PSMB5 dahil olmak üzere çoğu proteazom alt biriminin aşağı regüle edildiğini bulmuştur. 20S alt birimi PSMA3, BTZ dirençli hastalarda yukarı regüle edilmiştir ve MM hücre hatlarında aşırı eksprese edildiğinde direnç kazandığı bildirilmiştir (Xu vd., 2019).

Proteazomun kendisinden bağımsız direnç mekanizmaları da MM'de desteklenmiştir. PI'ler sitotoksik etkileri için proteostazın bozulmasına dayandığından, UPS bozulmasına dayanabilecek daha az salgılayıcı bir duruma geçerek direnç oluşturabilirler. X-box-protein 1 (XBP1), PC farklılaşması için kritik öneme sahiptir ve UPR düzenleyicisidir. XBP1 aktif formuna (Xbp1s) PC'lerin ve MM hücrelerinin proteostazı korumasını sağlayan Inositol gerektiren enzim 1α (Ire1 α) tarafından eklenir (Harnoss vd., 2019). Leung-Hgestejn ve meslektaşları, PI'ye dirençli hasta örneklerinde IRE1 α -Xbp1 yolu azalan regülasyonu bildirmişlerdir (Leung-Hagesteijn vd., 2013).

PI direncinin daha genel bir farmakokinetik mekanizması, artan ilaç taşınımı olabilmektedir. İlaç akış pompaları veya ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcıları, ilaçları ve bunların metabolitlerini hücre içi boşluktan hücre dışı boşluğa taşıyabilmektedirler (Besse vd., 2018). Artan ilaç taşınımı, ilaçların hücre içi hedefleriyle etkileşime girmesini önleyerek dirence yol açar. CFZ ve BTZ, çoklu ilaç taşıyıcı p-glikoprotein (MDR1) substratlarıdır (O'Connor vd., 2013). MDR1, PI tedavisine yanıt olarak ifade seviyesinde artış ile düzenlenir ve ayrıca PI'ye uyarlanmış MM hücre dizilerinde de tanımlanmıştır. MDR1 inhibisyonu, MM hücrelerini in vitro olarak PI'lere karşı yeniden duyarlı hale getirmektedir, ancak klinik olarak çok fazla yan etki göstermektedir (Abraham vd., 2015). Bu nedenle, farklı bir yaklaşıma ihtiyaç vardır. Nima ile ilişkili protein kinaz 2 (Nek2) birçok ABC

yolunu kontrol eder ve çeşitli çalışmalar yoluyla PI direnci ile ilişkilendirilmiştir (Gu vd., 2018).

2.5. Kanser-Testis Antijenleri

Kanser testis antijenleri (CTA), farklı histolojik kökenli insan tümörlerinde eksprese edilen, ancak testis ve plasenta dışında normal dokularda olmayan, tümörle ilişkili geniş bir antijen ailesidir(Fratta vd., 2011). MAGE-A1 olarak adlandırılan ilk CTA, MZ2-E, 1991 yılında sitotoksik T lenfositleri tarafından in vitro olarak tanınan bir melanom tümör antijeni olarak tanımlanmıştır (Van Der Bruggen vd., 1991). Daha sonra, Melanom hastalarının serumlarından oluşturulan bir rekombinant cDNA ekspresyon kütüphanesinin taranması, iki özelliği paylaşan yeni bir antijen ailesini ortaya çıkardı:

- i) mRNA ekspresyonu testisle ve nihayetinde çok az diğer dokular ile sınırlıydı.
- ii) Tümör gelişimi sırasında aktive olan mRNA ekspresyonu mevcuttur (Aurrière vd., 2021).

Daha sonra NY-ESO-1 ve SYCP1 genleri de keşfedildi(Türeci vd., 1998). CTA üretiminin dokuya özel olması, mRNA ekspresyon profillemesi yoluyla ek CTA genlerinin tanımlanması için çalışmalar yapılmıştır. Biyoinformatik analizi, cDNA oligonükleotid dizi analizi ve temsili fark analizi gibi farklı teknikler kullanılarak CT genlerinin testis ve kanserlere sınırlı ekspresyonu, diğer sağlıklı dokularda ekspresyonu yoktur. Bugüne kadar, farklı teknikler kullanılarak farklı üyelere ve ek varyantlarına sahip 100'den fazla CT gen ailesi rapor edilmiştir (Gordeeva, 2018). CTA'ların varlığı yaygın olarak birkaç tümörde tanımlanır; bununla birlikte, tümör tipleri arasında değişken olabilir. Örneğin, lenfoma, lösemi, kolon ve pankreas tümörlerinde düşük CTA seviyeleri tespit edilirken, melanom, yumurtalık ve akciğer kanserlerinde yüksek seviyeler bulunabilir. Belirli CTA genleri, tümör tipine özgü ifadeler gösterir; örneğin, melanom tümörlerinin %70'inin MAGE gen ailesinin en az bir genini ifade ettiği bulunmuştur (Jungbluth vd., 2005). CTA'lar orijinal olarak X-kromozomu üzerindeki genler tarafından CT-X genleri olarak kodlananlar ve genler otozomlar boyunca X-CT olmayan genler olarak dağılmış olanlar olarak sınıflandırılmıştır. X-olmayan CT genleri, ya spermatogenez sürecinde ya da ACRBP (akrosin bağlayıcı protein), ADAM2, mayotik proteinler (SCP1, HORMAD1 ve SYCE) gibi spermatidlerde işlevsel olarak katkıda bulunan proteinleri kodlar(Atanackovic vd., 2007). X olmayan genlerin çoğu mayoz sırasında veya sonrasında aktive olur, ancak mayoz öncesi aşamada değil. Normal dokulardaki CT gen ekspresyon profillerine göre, bunlar ayrıca dört gruba ayrılabilir(Shires ve Van Wyk, 2018).

- Birincisi, normalde testiste ve bazen de plasentada eksprese edilenlere 'testis kısıtlı genler' adı verilir.
- İkinci grup, merkezi sinir sisteminde (CNS) eksprese edilen genlerin yanı sıra 'testis/CNS-sınırlı genler' olarak adlandırılan yetişkin erkek testislerini içerir.
- Üçüncü grup, ifadeleri CNS dışında en fazla iki seçici doku ile yetişkin erkek testisinde bulunan genleri içerir; bunlar 'testis seçici genler' olarak bilinir.
- Testis/CNS seçici genler' olarak adlandırılan dördüncü grup, testis, CNS ve en fazla iki ek dokuda eksprese edilen genleri içerir.

2.5.1. Kanser-Testis Antijenleri ve Spermatogenez

Germ hattının kontrolünden ve korunmasından sorumlu olan CTA genleri, spermatogenezde birçok kritik ve farklı fonksiyona sahiptir (Maxfield vd., 2015b). Bugüne kadar CT genlerinin gametogenezdeki rolü tam olarak anlaşılamamıştır, ancak gen ekspresyonu ve nakavt çalışmaları bu genlerin farklı işlevlerine ışık tutmaktadır (Whitehurst, 2014). MAGE-A1 ve NY-ESO-1 gibi bazı CT genlerinin, spermatogenezin erken evrelerinde eksprese edildiği ve bu genlerin spermatogenezin başlamasına katkıda bulunabileceklerini bildirilmiştir (Atanackovic vd., 2007; Whitehurst, 2014). Bazı CT proteinleri, spermatositlerden sperm üretim aşamalarına kadar olan spermatogenezin geç aşamalarında tespit edilmiştir (Gjerstorff vd., 2007). GAGE proteininin, Oct4+ primordial germ hücrelerinde bulunduğu gibi eşey hücrelerinde kritik rol oynadığı düşünülmektedir (Gjerstorff vd., 2007). Ayrıca, bir grup CTA geni üzerinde yapılan gen hedefleme çalışmaları, bu CTA'ların erkek doğurganlığı için gerekli olduğunu göstermiştir. Örneğin, tek bir CTA'da eksik olan fareler, genellikle zayıflamış doğurganlık gösterir (O'Donnell vd., 2021). Spermatogenez, erkek testislerindeki seminifer tübüllerde spermatozoa üreten fizyolojik bir süreçtir (Lie vd., 2013). Seminifer tübüller yapısal olarak iki bölümden oluşur: kan/testis bariyeri (BTB) ile ayrılan bazal ve adluminal (Cheng vd., 2011). Bu yapılar, testosteron hormonu üreten Leydig hücrelerini içeren bağ dokuları tarafından korunur. Her Seminifer tübül epiteli, germ hücreleri ve Sertoli hücrelerinden oluşur. Germ hücreleri bazal membranda bulunur ve spermatogenez veya spermatogonyal kök hücreler (SSC) için progenitörler olarak kabul edilir. Bu SSC'lerin, mikro ortamdaki SSC'lerin sayısını korumak veya spermatositlere ve daha sonra spermatidlere farklılaşmak için kendi kendini yenilediği düşünülmektedir. Büyük spermatogonia bazal membrana yakın olduğunda, farklılaşmış spermatidler lümene yakın yerleştirildiğinde, hiyerarşik yapılar bazal kompartmanlarda görsel olarak görülebilir. Sertoli hücreleri, dokulara fiziksel destek

sağlamalarının yanı sıra spermatogenezde ilerleme ve farklılaşma sürecini kolaylaştıran kritik roller üstlenirler. İlginç bir şekilde Sertoli hücreleri, protein ve lenfositler gibi büyük moleküllerin istilasını önlemek için seminifer tübüllerin iki bölmesi arasında BTB bariyerini oluşturur (Mita vd., 2011). Bu bariyer, mayoz I ve mayoz II dahil olmak üzere spermatogenez olayını konakçı bağışıklık sisteminden uzakta özel bir mikro ortamda ayırır. Böylece BTB, testiste bağışıklık ayrıcalık bölgesi verir (Lie vd., 2013).

2.5.2. Kanser-Testis Antijenlerinin Düzenlenmesi

CTA ifadesinin kontrol edildiği mekanizma, açıkça kanser gelişimini durdurmak için ifadelerinin nasıl etkilenebileceğini anlamının anahtarıdır. Bu tümör antijenleri grubu hakkında ilginç olan şey, promotöre özgü DNA metilasyonu gibi ortak bir birincil aktivasyon ve baskı mekanizmasını paylaşmalarıdır. Normal somatik dokularda CTA ekspresyonunun baskılanmasının, daha 1994 yılında DNA metiltransferazlar (DNMT'ler) tarafından düzenlendiği bulunmuştur (Shires ve Van Wyk, 2018). Sitozin-guanin dinükleotidlerinde (CpG adaları) DNMT'ler tarafından DNA metilasyonu, metil-CpG bağlayıcı proteinlerin bu modifiye baz çiftlerine bağlanmasına izin vererek gen susturulmasına neden olur ve HDAC'ler gibi kromatin yeniden modelleme komplekslerinin işe alınmasına yol açar (Laduron vd., 2004). Bu da, oldukça kompakt bir kromatin yapısı nedeniyle önemli transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını önler. Bu tür gen düzenlemesinin, yukarıda bahsedilen MAGE-A ailesi ve PRAME genleri dahil, şimdiye kadar araştırılan tüm CTA'lar için geçerli olduğu gösterilmiştir (Shires vd., 2021). Çünkü bazı CTA bazlı immünoterapi kanser tedavileri, CTA ekspresyonunu arttırmanın ve immünojenik saldırıyı iyileştirmenin bir yolu olarak demetilasyon ajanlarının eklenmesiyle geliştirilmektedir (Shires ve Van Wyk, 2018).

2.5.3. Kanser-Testis Antijenlerinin Kanser Hücrelerindeki Rolü

Kanserler, germ hücreleri ile birçok ortak özelliği paylaşır ve tümör hücrelerinde germline genlerinin aktivasyonunun, tümörigenezin itici gücü olduğu düşünülür (Maxfield vd., 2015a). CTA genlerinin kanser gelişimi ve başlangıcındaki fonksiyonlarını belirlemek için son yıllarda kapsamlı araştırmalar yapılmıştır ve ortaya çıkan veriler, tümörlerde CTA genlerinin yeniden ekspresyonunun kanserin merkezi özelliklerini verebileceği fikriyle tutarlıdır. Mayoza özgü genler, spermatogenezin merkezi bir parçası olan mayoz bölünmenin indirgenmiş bir ayrımını fizyolojik olarak modüle eden (meiCT genleri olarak) olarak adlandırılan CTA genlerinin bir alt sınıfıdır. MeiCTA genlerinin çoğu, sağlıklı somatik hücrelerde normalde sessizdir, ancak anormal aktivasyonları, bu genlerin soma-

germline geçişine katkısı veya onkojenik kromozom dinamiklerine katılımları yoluyla onkogenezi tetikleyebilir (Kalejs ve Erenpreisa, 2005). Greenberg ve çalışma arkadaşları, normalde mayotik rekombinasyon düzenleyicileri olan MND1 ve HOP2'nin, normal telomeraz yokluğunda kanser hücrelerinde temel roller oynadığını bildirdiğinde, ortaya çıkan yeni kanıtlar kanser kromozomal dinamiklerinde meiCTA genlerinin önemli etkilerini göstermektedir(Arnoult ve Karlseder, 2014). MND1-HOP2 proteinleri, kanserli hücrelerin alternatif bir telomer uzatma mekanizması kullanmasına yardımcı olur. Ayrıca, mayozise özgü gen SYCP3'ün ekspresyonunun ploidi değışikliklerini yönlendirdiği ve kanser hücrelerinde kromozomal ayrışmayı doğrudan etkilediği bulunmuştur(Hosoya vd., 2012). Bununla birlikte, protein SYCP3'ün mitozdaki anormal varlığı, bir tümör baskılayıcı rekombinasyon düzenleyicisi olan BRCA2'nin işlevini bozarak rekombinasyonu bozar. Kanser hücrelerinin ilerlemesinde mayotik rekombinasyon düzenleyicilerinin aktivasyonunun rolüne ilişkin diğerk örnekler: RAD51 ve onun ortologu DMC1'in glioblastomada aktive edildiği, proliferatif potansiyelleri desteklediği bulunmuştur (Rivera vd., 2015). Sürekli büyüme, çoğalma ve hayatta kalma sinyallerini yöneten hücre döngüsü mekanizmasının bozulmasından kaynaklandığı bulunan tüm kanser hücrelerinin temel bir özelliğidir. Birçok CT geninin kanser hücresi büyümesi ve ilerlemesinde önemli roller oynadığı tespit edilmiştir. Örneğin, alışma, SSX2 CT gen ekspresyonundan yoksun melanom kanser hücrelerinin hücresel proliferasyonu büyük ölçüde azalttığını göstermiştir (Taylor vd., 2005). MAGE proteinleri, temel tümör baskılayıcı P53'ü bağlayan ve düzenleme işlevi gören fonksiyonel olarak iyi karakterize edilmiş CTA'lardır. Melanom hücrelerinde MAGE-A, MAGE-B ve MAGE-C proteinlerinin yıkım deneyleri, p53 aktivitesinde ve apoptozda önemli bir artış gösterdi (Yang vd., 2014). Ayrıca, çeşitli kanser hücrelerinde apoptotik direncin, GAGE benzeri CT gen ailesinin (GAGE ve PAGE) üyeleri tarafından indüklendiği bulunmuştur. GAGE-7, çeşitli apoptotik ajanlara yanıt olarak, apoptozu inhibe eder (Bode vd., 2014; D. Wang vd., 2022). Bununla birlikte, PAGE4 yıkımının tümör büyümesini durdurduğu gösterilmiştir(Kulkarni ve Uversky, 2017). Metastaz, EMT ile bağlantılı olduğu düşünölen kanser hücrelerinin bir özelliğidir. Bu süreç, epitel hücrelerinin bazı özelliklerini (hücre-hücre yapışması ve hücre polaritesi gibi) kaybetmelerine ve hareketlilik ve istila potansiyellerini artırmalarına izin verir. İlginç bir şekilde, bazı alışmalar CT genlerinin iyi huylu malignitelerde (metastatik olmayan) nadiren eksprese edildiğini bulmuştur. CT genlerinin metastazdaki fonksiyonel rollerinin bir göstergesi olabilir. GAGE proteinlerinin metastaz ve istiladaki doğrudan etkisi belirsizliğini koruyor olsa da, bu proteinlerin göç eden germ hücrelerinde ve ayrıca metastatik melanomda

varlığının, göç süreçlerine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Ayrıca, melanom hücre dizilerinde GAGE proteininin yıkılması, metastatik özelliklerini önemli ölçüde azalttı.

2.5.4. CTA'ların İşlevleri

CTA-X'in hem germ hattı dokularında hem de tümörlerde biyolojik rolü tam olarak anlaşılamamıştır (Hofmann vd., 2008). Son çalışmalar, CTA'nin insan tümörjenezinde rol oynayabileceğine dair bazı kanıtlar sağlamıştır. Şimdiye kadar CTA-X'in işleviyle ilgili birkaç sonuç ortaya çıkmış olsa da, X olmayan CTA'nin çoğu evrim sırasında korunur ve spermatogenez ile döllenmede bilinen önemli rollere sahiptir (Caballero ve Chen, 2009). Özellikle, tüm CT antijenleri, normal dokulardaki erkek germ hücreleriyle kesinlikle sınırlı değildir. Bazıları ayrıca testis kısıtlı (sadece testis), testis seçici (testis ve en fazla 2 ek doku) veya testis/beyin kısıtlı (testiste ve merkezi sinir sisteminde ifade edilir) olarak sınıflandırılabilir (Parmigiani vd., 2008). Testis dışındaki sınırlı sayıda normal dokuda bazı CT antijenlerinin ekspresyonunun, antijenik özelliklerini nasıl etkilediği ve terapötik hedefler olarak potansiyelleri büyük ölçüde çözülmemiş olarak kalmaktadır (Gjerstorff vd., 2015).

2.6. MM'da CTA

CTA ekspresyonunun kanser progresyonu ile güçlü ilişkisine rağmen, bu proteinlerin kanser gelişimindeki kesin rolü hala net değildir; bu kısmen, araştırma çabalarını karmaşıklatacak bir CTA kademesinin olası kümülatif etkilerinden kaynaklanıyor olabilir. MAGE proteinlerinin, özellikle MAGE-C1 ve MAGE-A3/A6'nın MM'nin malign fenotipindeki rolü birkaç grup tarafından araştırılmıştır (Bode vd., 2014). Kısa saç tokası (Sh) veya kısa enterferans yapan (Si) RNA molekülleri ile MM hücre hatlarında gen ekspresyonu yıkım yaklaşımları kullanılarak, bu özel MAGE antijenlerinin hücre döngüsü aktivasyonu ve anti-apoptotik süreçlerle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Taylor vd., 2005). Bu proteinlerin yıkılması (%70-80 inhibisyon) doğrudan proliferasyon oranlarının artmasına yol açmazken, sonuçlar CTA'ların G1-S hücre döngüsü geçişini desteklediğini göstermiştir (Jungbluth vd., 2005). Siklin D'nin CTA'lar tarafından doğrudan aktivasyonu henüz rapor edilmemiş olsa da, MAGE-C2'nin melanom hücre dizilerinde G1-S ilerlemesinde yer alan bir başka anahtar hücre içi siklin E seviyelerini arttırdığı ve hücreleri geçişe teşvik ettiği gösterilmiştir (Atanackovic vd., 2010). İnsan MM hücre dizilerindeki bu MAGE proteinlerinin anti-apoptotik etkilerinin, pro-kaspaz 12'ye bağlanma ve bunun bölünmesini ve aktivasyonunu

önleme yoluyla ER stres yanıtı apoptotik yolunun inhibisyonu yoluyla meydana geldiği bildirilmiştir (Shires ve Van Wyk, 2018). Malign bir fare modelinde, MAGE-A3'ün pro-kaspaz 12'ye bağlanmasının, hücre ölümünü tetikleyen kaspaz kaskadının azalan aktivasyonunu doğrudan önlediği gösterilmiştir (Atanackovic vd., 2010). Ayrıca MAGE A, B ve C ailelerinin üyelerinin, E3 ligaz TRIM28'e bağlanarak ve protein bozunma aktivasyonu yoluyla p53'ün baskılanmasını artırarak melanom ve kolon kanseri hücre dizilerinde apoptozu baskıladığı görülmektedir (Doyle vd., 2010).

Diğer önemli MM CTA'ların işlevleri henüz MM'de doğrudan doğrulanmazken, MM patogenezindeki rollerine ışık tutabilecek diğer malignitelerde PRAME ve SSX işlevleri araştırılmıştır (Madisson vd., 2014). Hepatoselüler karsinom hücre dizilerinde, hücre döngüsü aktivasyonunun (G1-S faz ilerlemesi) yanı sıra anti-apoptotik potansiyel gösterir ve fare modellerinde artan tümör büyümesini desteklediği gösterilmiştir (Zhu vd., 2018). SSX yıkım çalışmaları, ERK'nin fosforilasyonunun azaldığını ve c-MYC ekspresyonunun azaldığını gösterdi, bu da melanom hücrelerinde bu yolu aktive etmedeki rolünü göstermektedir (Madisson vd., 2014). SSX antijenleri, iskelet boyunca çoklu litik lezyonlarla (hastalığın yayılması) ilişkili olan gelişmiş MM'de eksprese edildiğinden, yapışmanın azalması MM patogenezinde adezyon moleküllerinin ekspresyonunu azaltarak önemli bir rol oynayabilir (Taylor vd., 2005; van Duin vd., 2011).

Doğrudan MM hücre hatları üzerinde yapılan çalışmaların sayısı şimdiye kadar sınırlı olmakla birlikte hem hücre döngüsü ilerlemesini hem de hücre sağkalımını teşvik etmede çoklu CTA'ların dahil olduğu görülmektedir. MM patogenezinin ayırt edici özellikleri ile ilgili olarak, kanıtlar CTA'ların siklin fonksiyonlarını teşvik etmede ve ayrıca p53 ekspresyonunu azaltmada ve kaspaz kaskadı inhibe etmede rol oynadığını göstermektedir. CTA'ların malign fonksiyonları da spermatogenez sürecinde gözlenenlere çok benzer görünmektedir (Colombo vd., 2015).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MM Hücrelerinin Kültürü

İnsan MM hücre hatları olan RPMI 8226 ve U266 TÜBİTAK 11Z383 Numaralı proje kapsamında ATCC'den temin edilmiştir. MM hücreleri RPMI 1640, %50 units/mL Penicillin/ Streptomisin ve inaktif edilmiş %10'luk Fetal Bovine Serum (FBS) içeren hücre kültürü ortamında çoğaltılmıştır. Hücre kültürleri, 37°C, %5'lik CO₂ ortamda tutulmuştur. Haftada iki kez, steril kabin içerisinde 1x10⁶ hücre/ml miktarda seyreltilerek pasajları yapılmıştır (bölünme süresi 50-70 saat). Ayrıca, MM hücre hatlarının ileride yapılacak olası çalışmalar sebebiyle saklanması için 5x10⁶ hücre, %70 RPMI1640, %20 FBS ve %10 DMSO'dan oluşan soğutulmuş solüsyon içerisinde -80°C'de muhafaza edilmektedir.

3.2. CFZ Dirençli MM Hücre Serilerinin Oluşturulması

CFZ Dirençli RPMI 8226 ve U266 hücrelerin oluşturulmasında kullanılan CFZ (PR-171), Sellekchem (S 2853) Firmasından steril olarak 99.75% saflıkta, 10 mg'lık toz halinde satın alınmıştır ve steril DMSO ile çözülmüştür.

3.2.1. MTT Analizi

CFZ dirençli RPMI 8226 ve U266 hücreleri CFZ muamelesine başlamadan 1 gün önce pasaj yapılmadan taze besiyeri ile beslenmiştir. Hücreleri sayabilmek için Tripan mavisi testi uygulanmıştır. Canlı hücrelerin boyayı almayıp, ölü hücrelerin boyayı alması esasına dayanan yöntemde canlı ve ölü hücreler Thoma lamı kullanılarak ml'deki hücre sayısı hesaplanmıştır. CFZ dirençli RPMI 8226 ve U266 hücreleri 40.000 hücre/μl miktarda 96 kuyucuklu plakalara yerleştirilmiş ve farklı dozlarda CFZ ile 72 saat inkübe edilmiştir. Kontrol hücrelere %1 konsantrasyonunu geçmeyecek ve toksik etki göstermeyecek şekilde DMSO (CFZ çözücüsü olduğu için aynı oranlarda kullanılmıştır) muamelesi yapılmıştır. Belirlenen zaman zarfının sonunda hücreleri içeren kuyucuklara ve Blank olarak kullanılan hücre içermeyen besiyerine 10 μl MTT ajanı konulmuş ve 4 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben kuyucuklara 100μl MTT lizis solüsyonu eklenmiş ve 37 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi sabah spektrofotometrede (Thermo Fischer) 570 nm ve 690 nm dalga boylarında ölçülmüştür. Tüm deneyler 3 veya 4 tekrarlı olarak yapılmıştır. Hücre canlılığı yüzdesi hesaplanırken, 570 nm dalga boyunda okunan üç tekrarlı değerlerin ortalaması alınarak her bir konsantrasyona ait değerden çıkarılmıştır (690nm- 570nm). Daha sonra, kontrol ve diğer dozajlardaki üçlü tekrarların ortalaması

alınmıştır. Kontrole ait değer 100% alınarak, diğer dozajların yüzdesi hesaplandı ve hücre canlılığı bulunmuştur.

3.2.2. CFZ Dirençli MM Hücre Serlerinin Oluşturulması

CFZ dirençli RPMI 8226 ve U266 hücrelerin oluşturulması çalışmalarında RPMI 8226 ve U266 hücreleri en az üç farklı zamanda 72 saat süreyle CFZ'e maruz bırakılarak CFZ IC₂₅₋₈₀ değerleri hesaplanmıştır (Tablo 3.1.). CFZ IC değerleri belirlendikten sonra, RPMI 8226 ve U266 hücreleri ilk olarak IC₃₀ dozları ile 24 saat muamele edilmiştir. İlgili CFZ dozu (RPMI 8226 için 24,06 nM; U266 için 11,26 nM) ile 24 saat inkübasyonun ardından hücreler 200g'de santrifüj edilerek ilaçlı besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler taze besiyerine alınmıştır. CFZ'e maruz bırakılan hücreler kendilerini toparladıkları ve çoğalmaya başladıkları zaman basamak basamak artan CFZ'in üst konsantrasyonlarına maruz bırakılmış böylece CFZ dirençli hücreler elde edilmiştir. Deneylerde kullanılmadan önce CFZ dirençli hücreler iki kez ilaçsız ortamda pasajlanmıştır. CFZ hassas (parental) RPMI 8226 ve U266 hücreler ise CFZ dirençli RPMI 8226 ve U266 hücrelerine uygulanan CFZ içeriğindeki DMSO miktarı uygulanarak elde edilmiştir. CFZ ile muamele edilen hücrelerde direnç oluşup oluşmadığını belirlemek amacıyla Direnç Katsayısı (Resistance Index) belirlenmiştir. Direnç Katsayısı = Dirençli Hücre Hattı CFZ IC₅₀ / Parental Hücre Hattı CFZ IC₅₀ şeklinde hesaplanmıştır (Coley, 2004; Govindan vd., 2015; Zuo vd., 2015).

Tablo 3.1. CFZ ile muamele edilen RPMI 8226 ve U266 hücrelerinde inhibitör konsantrasyon (IC) değerleri

IC Değerleri	RPMI 8226	U266
IC ₂₅	18,777 nM	7,421 nM
IC ₃₀	24,064 nM	11,267 nM
IC ₃₅	29,350 nM	15,113 nM
IC ₄₀	34,637 nM	18,960 nM
IC ₄₅	39,923 nM	22,806 nM
IC ₅₀	45,210 nM	26,652 nM
IC ₆₀	55,783 nM	34,345 nM
IC ₇₀	66,356 nM	42,038 nM
IC ₈₀	76,929 nM	49,731 nM

3.3. RNA İzolasyonu ve qPCR Çalışmaları

3.3.1. RNA İzolasyonu ve Kantitasyonu

CFZ dirençli ve hassas RPMI 8226 ve U266 hücrelerinden total RNA izolasyonu NucleoZOL reaktifi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 1.5×10^6 CFZ dirençli ve hassas RPMI 8226 ve U266 hücreleri DNaz ve RNaz içermeyen eppendorf tüplerine konulmuştur. PBS ile yıkanan hücrelerin üzerine 500 µl NucleoZOL ve 200 µl RNaz/DNaz içermeyen su eklendikten sonra tüpler 15 saniye kuvvetlice çalkalandı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben tüpler 12000 g de 15 dakika santrifüj edilmiş ve 500 µl süpernatant yeni eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Tüplere aktarılan süpernatantın üzerine 500 µl İzopropanol ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra, tüpler 12000 g de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış ve 500 µl %75'lik Etanol eklenmiştir. Tüpler 8000 g'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış ve pellet kurumaya bırakılmıştır. Kuruduktan sonra tüplere 30 µl DNaz /RNaz içermeyen su ilave edilmiştir. Elde edilen RNA'ların miktar ve saflığının belirlenmesi için Epoch mikropilaka spektrofotometre okuyucusu Take3 plakası ile kullanılmıştır. Çözülmüş RNA örneğinden 2 µl alınıp, 0,2ml'lik steril eppendorf tüp içinde son hacim 4 µl olacak şekilde DNaz/RNaz içermeyen su ile tamamlanmıştır. Spektrofotometrede OD260 ve OD280 değerleri ölçüldü. OD260 ve OD280 değerlerinin oranı hesaplanarak RNA'nın saflığı belirlenmiştir.

3.3.2. cDNA Sentezi

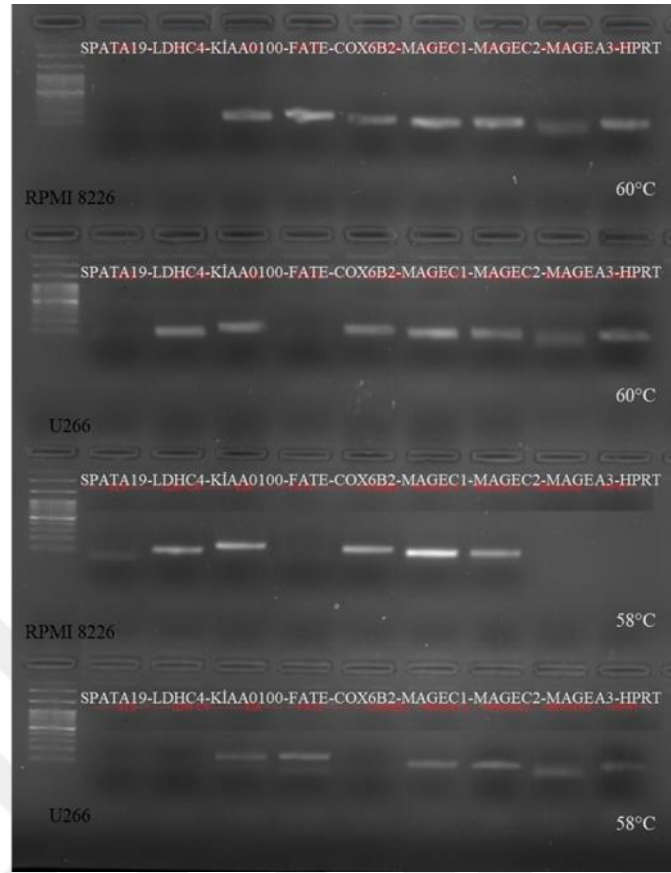
CFZ dirençli ve hassas RPMI 8226 ve U266 hücrelerinden elde edilen total RNA'lardan 1µg/µl konsantrasyonunda olmak üzere cDNA'lar üretici firma tarafından sağlanan İScript Reverse Transkripsiyon kit (BioRad) protokolüne uygun olarak elde edilmiştir. cDNA sentezi sırasında NYX Teknik Apollo ATC 201 cihazı kullanılmıştır.

3.3.3. Kantitatif Eş-Zamanlı PCR ve İstatiksel analiz

CFZ dirençli ve hassas hücrelerde MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-A3, COX6B2, KIAA0100, LDH-C4 ve SPATA19 mRNA ekspresyonlarının kantitasyonu SYBR Green floresans boyası (Roche) ve Roche LightCycler® 480 II kullanılarak yapılmıştır. İlgili genlere özgü primerler, Pearl programı kullanılarak tasarlanmış ve primer dizilimlerinin özgünlüğü Primer Blast (NCBI) programı kullanılarak incelenmiştir. İlgili genlere özgü tasarlanan primerlerin dizileri Tablo 3.2'de belirtilmiştir. İlgili genlere özgü tasarlanan

primerlerin Tm derecesi Gradient PCR ile tayin edilmiş ve 60 °C olarak bulunmuştur (Şekil 3.1). qPCR reaksiyonu 10 µl toplam hacimde, LightCycler 480 SYBR Green I master mix 5 µl, 0,5 µl forward primer, 0,5 µl revers primer, 1 µl cDNA ve dH2O'u içermiştir. qPCR reaksiyonu toplam 45 döngü olmak üzere 95°C'de 10 sn denatürasyon, 60°C'de 15 sn annealing ve 72°C'de 10 sn uzama şeklinde gerçekleştirilmiştir. Primer dimerizasyonu ise Roche LightCycler® 480 II'in melting temperature özelliği kullanılarak kontrol edilmiştir. İlgili genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri hipoksantin guanin fosforiboziltransferaz (HPRT)'e göre normalize edilmiştir. Bağlı mRNA ifade değişiklikleri 2-ΔCt eşik yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir.

En az üç farklı zamanda yapılan deneyler sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizinde Graphpad Prism 6 for Windows® paket Programı kullanılmıştır. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi sırasında bir parametre açısından iki grup arasındaki anlamlı farkların belirlenmesinde bağımsız örneklem Student (unpaired) t-test ve bir parametre arasındaki anlamlı farkların belirlenmesinde One Way Anova-posthoc (Tukey) kullanılmıştır. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 3.1. MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-A3, LDH-C4, COX6B2, FATE1, KIAA0100 ve HPRT primerlerinin Gradient PCR ile Tm derecelerinin tayin edilmesi

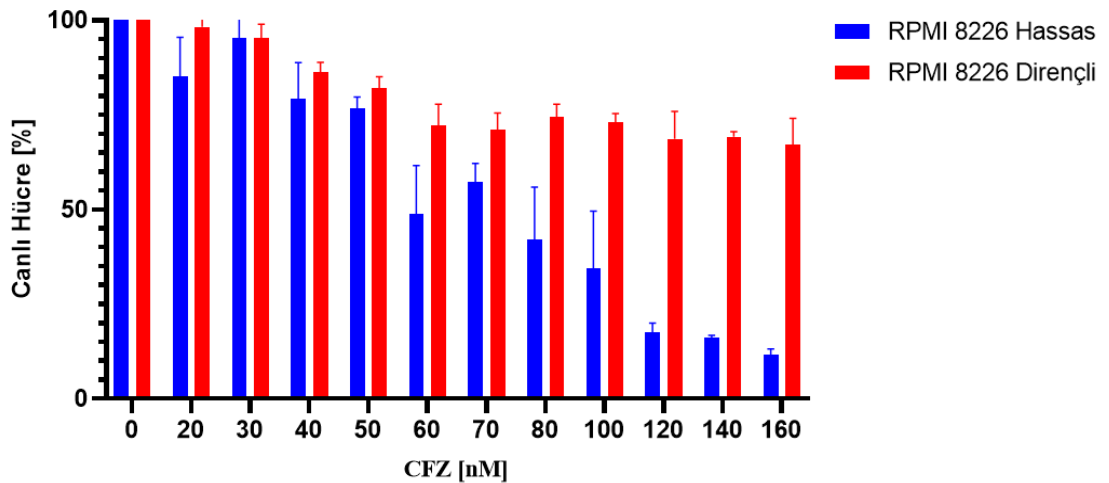
Tablo 3.2. İlgili genlere özgü tasarlanan primerlerin dizileri, uzunluk ve Tm değeri bilgileri

İlgili Genler			Primer Uzunluğu	Tm (°C)
KIAA0100	F	GGAAGGGGCTGTGGATACCT	20	60°C
	R	GACCCGTTGCTTCTTCTCACTA	22	
COXB2	F	AGTGGGTGGAGACCAGAGA	19	60°C
	R	ATGGTGAGGGCGTTAGAAA	19	
LDH-C4	F	GGAACGGATTCAGATAAGGAAC	22	60°C
	R	CAGTCCAATAGCCCAAGAGG	20	
SPATA19	F	TAGAGGAGAGAACACGAATCC	21	60°C
	R	CTTCGTCTCACCTGCTCTATT	21	
MAGE-C1	F	AAGTGGACCCTGATGACTCC	20	60°C
	R	AGAATCAGGAGGCGGTTCTG	20	
MAGE-C2	F	CCAGAAAGGGGAGGATACAGG	21	60°C
	R	GGAGCAGGAACTCCACTAACTC	22	
MAGE-A3	F	AGCCTCCCCACTACCATGAA	20	60°C
	R	ACTCCAGGTCAGGGAAGGTG	20	

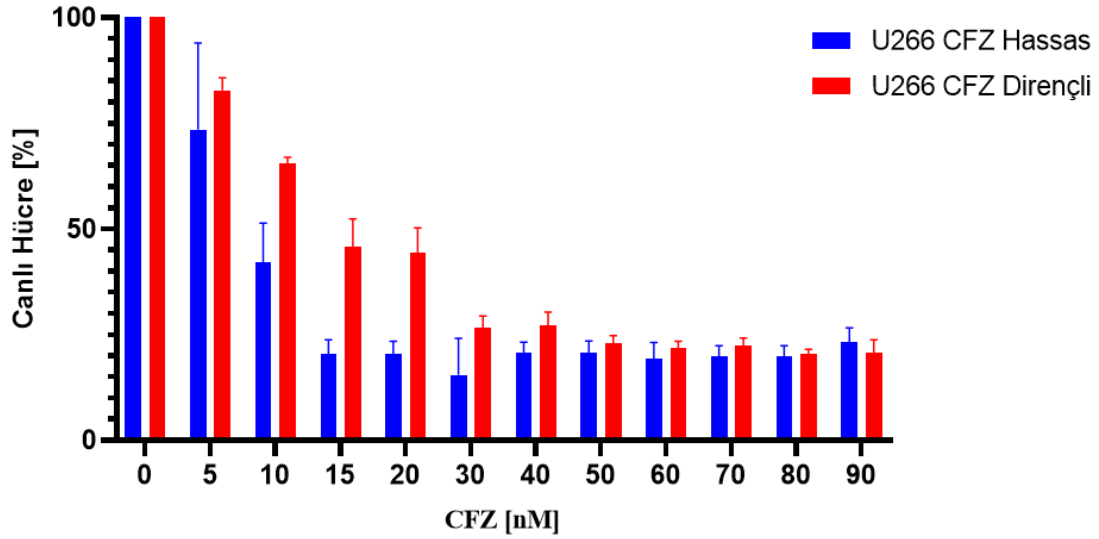
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. CFZ Dirençli Hücrelerin Oluşturulması

RPMI 8226 ve U266 hücre serilerinden CFZ dirençli RPMI 8226 ve U266 hücre serilerinin oluşturulması yaklaşık 15 ay sürmüştür. Bu süre boyunca CFZ ile muamele edilen RPMI 8226 ve U266 hücrelerinde hücre canlılığı yüzdesinin ve CFZ IC değerlerinin hesaplanmasında MTT analizi kullanılmıştır. CFZ dirençli MM hücreleri, parental hücrelerin (buradan sonra CFZ hassas olarak bahsedilecektir) artan konsantrasyonlarda CFZ ile muamele edilmesiyle oluşturulmuştur. İlk olarak, RPMI 8226 ve U266 hücrelerinde CFZ IC₃₀ değerinin uygulanması ile direnç oluşturulmaya başlanılmıştır. Daha sonraki aşamalarda ölü hücreler uzaklaştırılmış ve sağ kalan canlı hücrelerle aşama aşama CFZ konsantrasyonu artırılarak devam edilmiştir. Uygulanan konsantrasyonlar Tablo 2.1’de belirtilmiştir. RPMI 8226 ve U266 hücrelerinde sırasıyla IC₈₀ (76,92 nM) ve IC₇₀ (42,03 nM) konsantrasyonlarından daha yüksek konsantrasyonlar uygulandığında hücrelerin çoğunluğu öldüğü için CFZ uygulaması bu konsantrasyonlarda durdurulmuştur. Aşama aşama ilaç uygulanması sonucunda elde edilen dirençli hücreler deneylerde kullanılmaya başlanmadan önce en az iki kez ilaçsız besiyerinde pasajlanmıştır. Yapılan MTT analizi sonuçlarına göre CFZ hassas ve CFZ dirençli RPMI 8226 ve U266 hücre hatlarında uygulanan CFZ dozajları ile hücre hayatta kalma eğrileri Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. CFZ hassas ve CFZ dirençli RPMI 8226 hücrelerinde artan CFZ konsantrasyonlarına karşı azalan hücre canlılığı

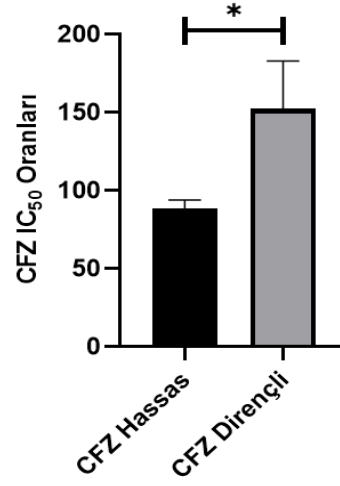


Şekil 4.2. CFZ hassas ve CFZ dirençli U266 hücrelerinde artan CFZ konsantrasyonlarına karşı azalan hücre canlılığı

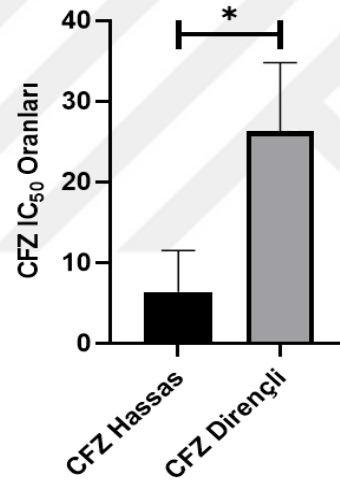
4.1.2 CFZ Dirençli Hücrelerde Direnç Katsayısının ve MDR1 Gen Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi

CFZ dirençli RPMI 8226 hücreleri için Direnç Katsayısı, 4 farklı zamanda yapılan MTT analizi sonuçlarının Microsoft Excel Programı'nda hesaplanması ile bulunmuştur. Bu 4 farklı IC_{50} değerlerinin ortalaması alınarak RPMI 8226 hücreleri için Direnç Katsayısı 2.26 kat olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3.). U266 hücreleri için Direnç Katsayısı, 3 farklı zamanda yapılan MTT analizi sonuçlarının Microsoft Excel Programı'nda IC_{50} değerlerinin hesaplanması ve bu değerlerin ortalaması alınarak bulunmuştur. U266 hücreleri için Direnç Katsayısı 5.9 kat olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4.).

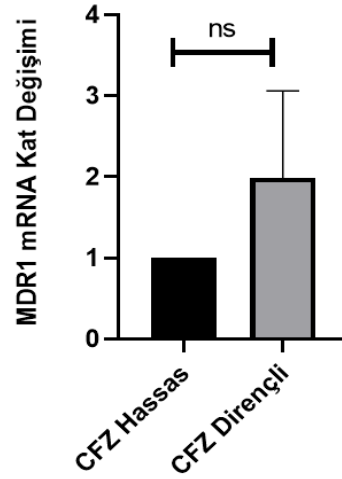
Yapılan çalışmalar, CFZ dirençli MM hücrelerinde direnç gelişim mekanizmalarından biri olan ABCB1/p-glikoproteini'nin aşırı ifade edildiğini bildirmektedir (Besse vd., 2018; Hawley vd., 2013)). Bu nedenle, CFZ dirençli RPMI 8226 ve U266 hücrelerinde MDR1/p-glikoprotein geninin ekspresyon düzeyi qPCR ile belirlenmiştir. Bu amaç doğrultusunda üç farklı zamanda CFZ hassas ve dirençli RPMI 8226 ve U266 hücrelerinden RNA izole edip, elde edilen RNA'lar cDNA'a dönüştürülmüştür. qPCR sonuçlarına göre, CFZ hassas RPMI 8226 ve U266 hücrelerine kıyasla CFZ dirençli RPMI 8226 ve U266 hücrelerde MDR1 mRNA seviyesinin arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.5. ve 4.6.).



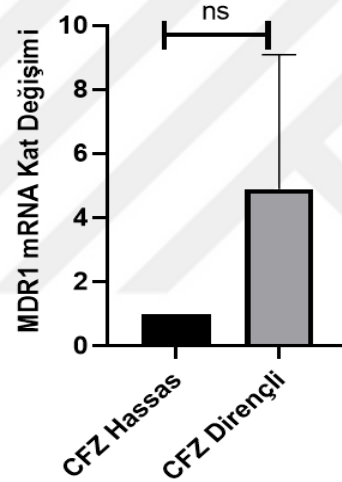
Şekil 4.3.CFZ hassas ve CFZ dirençli RPMI 8226 hücrelerinde CFZ IC50 oranlarının karşılaştırılması



Şekil 4.4.CFZ hassas ve CFZ dirençli U266 hücrelerinde CFZ IC50 oranlarının karşılaştırılması



Şekil 4.5.CFZ hassas ve dirençli RPMI 8226 hücrelerinde MDR1 mRNA kat değişimi



Şekil 4.6.CFZ hassas ve dirençli U266 hücrelerinde MDR1 mRNA kat artışı

4.2. CFZ Dirençli MM Hücrelerinde CTA Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

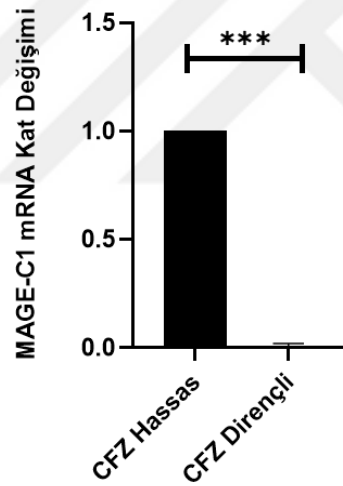
CFZ dirençli MM hücrelerinde CTA genlerinin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi amacıyla; CFZ hassas ve CFZ dirençli U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde MAGE ailesi üyelerinden daha önce MM hücrelerinde ve hastalarında ekspresyonları ve fonksiyonları çalışılan MAGE-C1, MAGE-C2 ve MAGE-A3; mitokondri üzerinde etkili olduğu rapor edilen COX6B2, KIAA0100, LDH-4 ve SPATA19 q-PCR ile çalışılmıştır. İlgili genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri HPRT'e göre normalize edilmiştir.

4.2.1. MAGE-C1 Geninin Ekspresyon Düzeyi

CFZ hassas ve CFZ dirençli U266 hücrelerinde MAGE-C1 geninin ekspresyonu tespit edilememiştir.

MAGE-C1 geninin ekspresyon düzeyi CFZ hassas ve CFZ dirençli RPMI 8226 hücrelerinde incelendiğinde, CFZ hassas hücelere kıyasla dirençli hücrelerde MAGE-C1 mRNA düzeyinde anlamlı azalma tespit edilmiştir ($p<0.0001$). MAGE-C1 mRNA kat değişimi Şekil 4.7.'de gösterilmiştir. MAGE-C1 mRNA kat değişimi aşağıdaki formülasyonda belirtildiği üzere hesaplanmış, CFZ hassas hücelere kıyasla CFZ dirençli RPMI 8226 hücrelerinde 103 kat azaldığı tespit edilmiştir.

$$MAGE - C1 \text{ mRNA Kat Değişimi} \frac{\text{Normal}}{\text{Direnç}} = \frac{1}{0,0097} = 103,09 \text{ kat azalmıştır.}$$

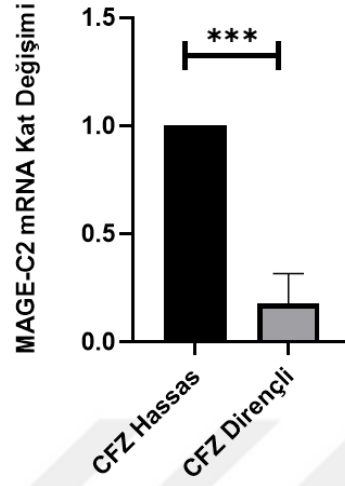


Şekil 4.7. CFZ hassas ve CFZ dirençli RPMI 8226 hücrelerinde MAGE-C1gen ekspresyon düzeyindeki kat azalışı

4.2.2. MAGE-C2 Geninin Ekspresyon Düzeyi

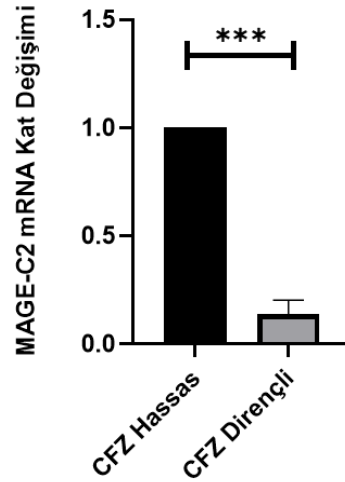
MAGE-C2 geninin ekspresyon düzeyleri CFZ hassas ve CFZ dirençli U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde incelendiğinde, CFZ hassas hücelere kıyasla dirençli hücrelerde MAGE-C2 mRNA düzeylerinde anlamlı azalma tespit edilmiştir ($p<0.0001$). MAGE-C2 mRNA kat değişimi Şekil 4.8.ve 4.9.'da gösterilmiştir. MAGE-C2 mRNA kat değişimi aşağıdaki

formülasyonda belirtildiği üzere hesaplanmış, CFZ hassas hücelere kıyasla CFZ dirençli U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde sırasıyla yaklaşık 6 kat ve 7 kat azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.8. CFZ hassas ve CFZ dirençli U266 hücrelerinde MAGE-C2gen ekspresyon düzeyindeki kat azalışı

$$MAGE - C2 mRNA Kat Değişimi \frac{Normal}{Direnç} = \frac{1}{0,1764} = 5,66 \text{ kat azalmıştır.}$$

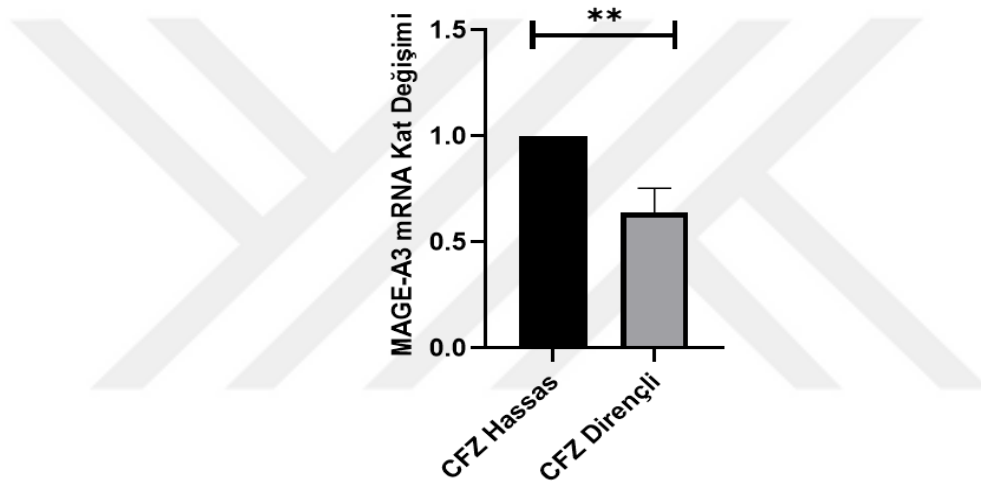


Şekil 4.9. CFZ hassas ve CFZ dirençli RPMI 8226 hücrelerinde MAGE-C2 gen ekspresyon düzeyindeki kat azalışı

$$MAGE - C2 mRNA Kat Değişimi \frac{Normal}{Direnç} = \frac{1}{0,1368} = 7,30 \text{ kat azalmıştır.}$$

4.2.3. MAGE-A3 Geninin Ekspresyon Düzeyi

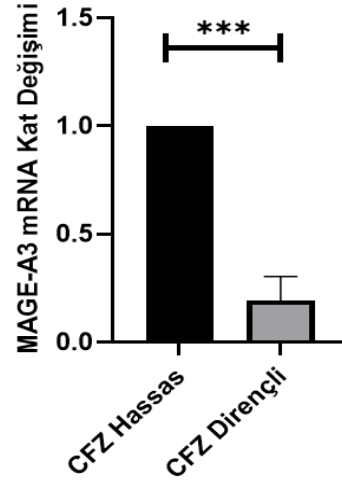
MAGE-A3 geninin ekspresyon düzeyleri CFZ hassas ve CFZ dirençli U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde incelendiğinde, CFZ hassas hücrelere kıyasla dirençli hücrelerde MAGE-A3 mRNA düzeylerinde anlamlı azalma tespit edilmiştir ($p<0.0056$) ($p<0.0002$). MAGE-A3 mRNA kat değişimi Şekil 4.10. ve 4.11.'de gösterilmiştir. MAGE-A3 mRNA kat değişimi aşağıdaki formülasyonda belirtildiği üzere hesaplanmış, CFZ hassas hücrelere kıyasla CFZ dirençli U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde sırasıyla 1,6 kat ve 5,2 kat azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.10. CFZ hassas ve CFZ dirençli U266 hücrelerinde MAGE-A3 gen ekspresyon düzeyindeki kat azalışı

Şekil 4.10.

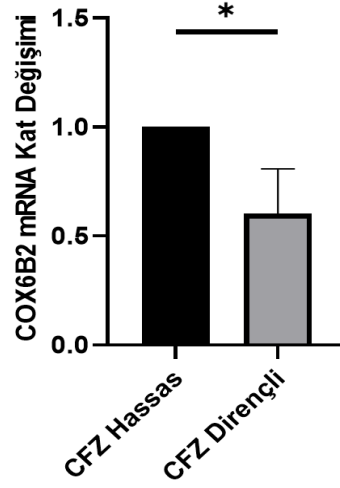
$$MAGE - A3 \text{ mRNA Kat Değişimi} \frac{\text{Normal}}{\text{Direnç}} = \frac{1}{0,6381} = 1,567 \text{ kat azalmıştır.}$$



$$MAGE - A3 \text{ mRNA Kat Değişimi} \frac{\text{Normal}}{\text{Direnç}} = \frac{1}{0,1913} = 5,227 \text{ kat azalmıştır.}$$

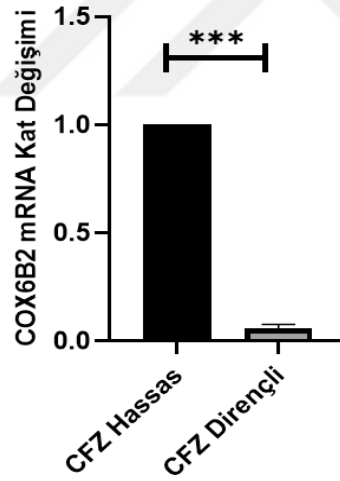
4.2.4. COX6B2 Geninin Ekspresyon Düzeyi

Mitokondri üzerinde etkili olan CTA'lerden COX6B2 geninin ekspresyon düzeyleri CFZ hassas ve CFZ dirençli U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde incelendiğinde, CFZ hassas hücrelere kıyasla dirençli hücrelerde COX6B2 mRNA düzeyinde anlamlı azalma tespit edilmiştir ($p < 0.0001$) ($p < 0.002$). COX6B2 mRNA kat değişimi Şekil 4.12. ve 4.13.'de gösterilmiştir. COX6B2 mRNA kat değişimi aşağıdaki formülasyonda belirtildiği üzere hesaplanmış, CFZ hassas hücrelere kıyasla CFZ dirençli U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde 1,66 kat ve 17,5 kat azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.11. CFZ hassas ve CFZ dirençli U266 hücrelerinde COX6B2 gen ekspresyon düzeyindeki kat azalışı

$$COX6B2 \text{ mRNA Kat Değişimi} \frac{\text{Normal}}{\text{Direnç}} = \frac{1}{0,6} = 1,66 \text{ kat azalmıştır.}$$



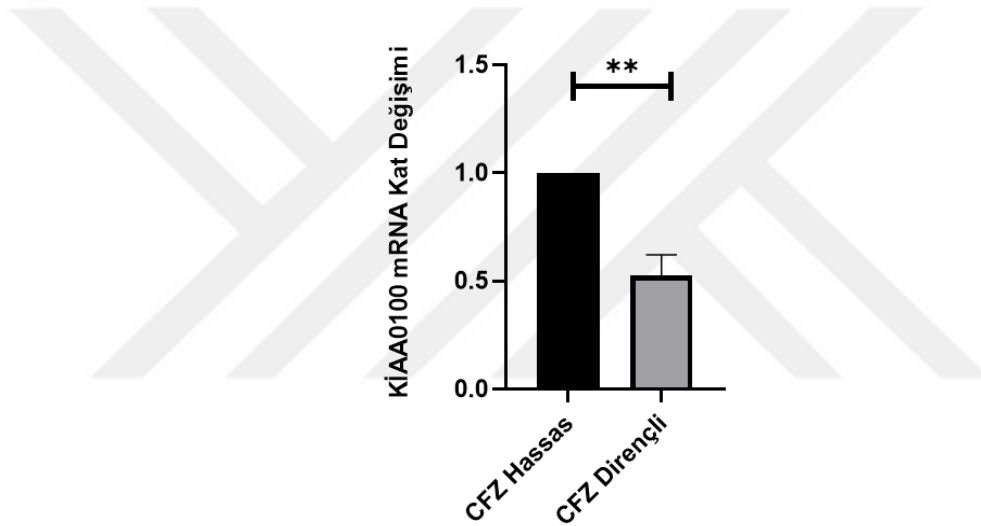
Şekil 4.12. CFZ hassas ve CFZ dirençli RPMI 8226 hücrelerinde COX6B2 gen ekspresyon düzeyindeki kat azalışı

$$COX6B2 \text{ mRNA Kat Değişimi} \frac{\text{Normal}}{\text{Direnç}} = \frac{1}{0,057} = 17,54 \text{ kat azalmıştır.}$$

4.2.5. KIAA0100 Geninin Ekspresyon Düzeyi

CFZ hassas ve CFZ dirençli U266 hücrelerinde mitokondride etkili KIAA0100 geninin ekspresyonu tespit edilememiştir.

CFZ hassas ve CFZ dirençli RPMI 8226 hücrelerinde KIAA0100 geninin ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, CFZ hassas hücelere kıyasla dirençli hücrelerde KIAA0100 mRNA düzeyinde anlamlı azalma tespit edilmiştir ($p<0.0011$). KIAA0100 mRNA kat değişimi Şekil 4.14.'de gösterilmiştir. KIAA0100 mRNA kat değişimi aşağıdaki formülasyonda belirtildiği üzere hesaplanmış, CFZ hassas hücelere kıyasla CFZ dirençli RPMI 8226 hücrelerinde 1,9 kat azaldığı tespit edilmiştir.

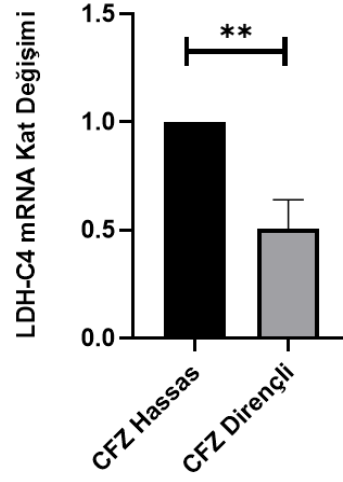


Şekil 4.13. CFZ hassas ve CFZ dirençli RPMI 8226 hücrelerinde KIAA0100 gen ekspresyon düzeyindeki kat azalışı

$$KIAA0100 \text{ mRNA Kat Değişimi} = \frac{\text{Normal}}{\text{Direnç}} = \frac{1}{0,5229} = 1,912 \text{ kat azalmıştır.}$$

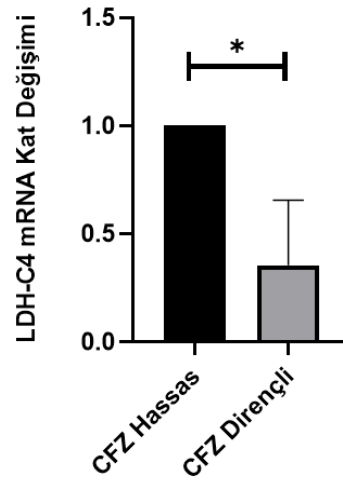
4.2.6. LDH-C4 Geninin Ekspresyon Düzeyi

LDH-C4 geninin ekspresyon düzeyleri CFZ hassas ve CFZ dirençli U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde incelendiğinde, CFZ hassas hücelere kıyasla dirençli hücrelerde LDH-C4 mRNA düzeyinde anlamlı azalma tespit edilmiştir ($p<0.003$) ($p<0.0206$). LDH-C4 mRNA kat değişimi Şekil 4.15. ve 4.16.'de gösterilmiştir. LDH-C4 mRNA kat değişimi aşağıdaki formülasyonda belirtildiği üzere hesaplanmış, CFZ hassas hücelere kıyasla CFZ dirençli U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde 1,9 kat ve 2,8 kat azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.14. CFZ hassas ve CFZ dirençli U266 hücrelerinde LDH-C4 gen ekspresyon düzeyindeki kat azalışı

$$LDH - C4 mRNA Kat Değişimi \frac{Normal}{Direnç} = \frac{1}{0,5069} = 1,972 \text{ kat azalmıştır.}$$

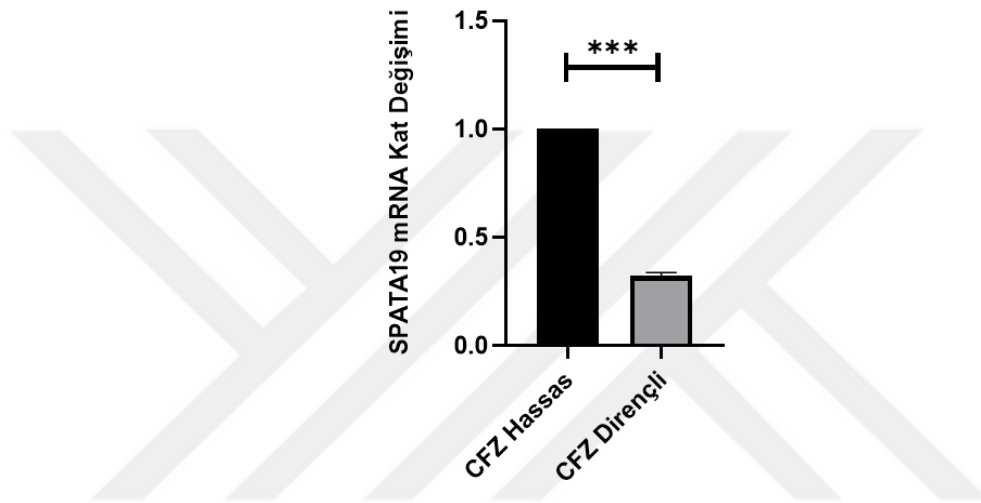


Şekil 4.15. CFZ hassas ve CFZ dirençli RPMI 8226 hücrelerinde LDH-C4 gen ekspresyon düzeyindeki kat azalışı

$$LDH - C4 mRNA Kat Değişimi \frac{Normal}{Direnç} = \frac{1}{0,3556} = 2,812 \text{ kat azalmıştır.}$$

4.2.7. SPATA19 Geninin Ekspresyon Düzeyi

SPATA19 geninin ekspresyon düzeyleri CFZ hassas ve CFZ dirençli U266 hücrelerinde incelendiğinde, CFZ hassas hücelere kıyasla dirençli hücrelerde SPATA19 mRNA düzeyinde anlamlı azalma tespit edilmiştir ($p<0.0001$). SPATA19 mRNA kat değişimi Şekil 4.17.'de gösterilmiştir. SPATA19 mRNA kat değişimi aşağıdaki formülasyonda belirtildiği üzere hesaplanmış, CFZ hassas hücelere kıyasla CFZ dirençli U266 hücrelerinde 3,1 kat azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.16. CFZ hassas ve CFZ dirençli U266 hücrelerinde SPATA19 gen ekspresyon düzeyindeki kat azalışı

$$SPATA19 \text{ mRNA Kat Değişimi} \frac{\text{Normal}}{\text{Direnç}} = \frac{1}{0,3216} = 3,109 \text{ kat azalmıştır.}$$

CFZ hassas ve CFZ dirençli RPMI 8266 hücrelerinde mitokondride etkili SPATA19 geninin ekspresyonu tespit edilememiştir.

Yapılan bu çalışmada, CFZ hassas ve dirençli RPMI 8226 ve U266 hücre hatlarında CTA genlerinden MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-A3, COX6B2, KIAA0100, LDH-C4 ve SPATA19'un gen ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler qPCR kullanılarak araştırılmış ve böylece belirtilen CTA'nin CFZ direncinde rol oynayıp oynamadıklarına dair fikir elde edilmeye çalışılmıştır.

MM, lenfomadan sonra en yaygın ikinci hematolojik malignite olup, UPR ve ER streslerini uyaran ve fonksiyonel olmayan Ig üretimi ile karakterize edilir (Breznik vd., 2017). Mevcut çeşitli tedavi seçeneklerine rağmen, hastaların çoğunun değişken bir tedavi süresinden sonra kaçınılmaz olarak relaps ve mevcut tedavilere dirençli hale gelmesinden (refrakter) dolayı MM hâlâ öldürücü maligniteler arasında yer almaktadır (Besse vd., 2018). MM'da proteazom inhibisyonu, hücre içi proteinlerin birikip hücrenin ölümüne sebep olmasından dolayı ilk nesil BTZ, MM hastalarının sağ kalım sürelerini iyileştirmede devrim yaratmıştır. İkinci nesil CFZ, klinikte BTZ dirençli hastalarda oluşan direncin üstesinden gelerek ölüm riskinde önemli bir azalma sağlamaktadır (Robak vd., 2018). Bununla birlikte, CFZ tedavisi altında gelişen ilaç direnci, şu anda MM'da terapötik başarıyı sınırlandırmaktadır ve ayrıca bugüne kadar CFZ direnç mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır (Besse vd., 2018). Buna karşılık, çeşitli hücre serilerinde BTZ ve CFZ direnç mekanizması olarak PSMB5 mutasyonlarının varlığı ve PSMB5 geninin upregülasyonu gösterilmektedir (Leonardo-sousa vd., 2022). Neoplastik ajanlara karşı gelişen dirençte, ABC dışı akış pompa taşıyıcılarının yukarı regülasyonu yaygın bir direnç mekanizmasıdır. Nitekim, yakın zamanda, CFZ direncinde, ABC taşıyıcı ABCB1 (MDR1)'in aşırı ekspresyonu gösterilmiştir (Besse vd., 2018).

CFZ, çoğu hücreyel proteinin homeostazından sorumlu büyük bir multikatalitik enzimatik kompleks olan proteazomun etkisini engelleyen bir tetrapeptid epoksi ketondur (Muchtar vd., 2016). CFZ proteazomun $\beta 5$ alt biriminin kimotriptik aktivitesini inhibe eder. Tüm proteazom alt birimlerinin inhibisyonu, hematolojik tümör ve aynı zamanda periferik kan mononükleer hücrelerinde sitotoksik etkilere yol açar. (Groen vd., 2019). Bu hücreyel mekanizmanın bloke edilmesi, apoptotik hücre ölümüne yol açabilen, hücreyel protein homeostazını bozmaktadır (Soriano vd., 2016).

Normal koşullar altında CTA genleri, esas olarak germ hücrelerinde ve özellikle testislerde eksprese edilir ve ekspresyonları normal dokularda oldukça azdır veya yoktur. Ancak, çok sayıda kanser çeşidinde CTA'ların yeniden aktive olduğu ve ayrıca ekspresyonlarının hastalığın daha agresif formları ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. MAGE

CTA gen ailesi, çok çeşitli malign neoplazmlarda eksprese edilmektedir. CTA antijenlerinin ekspresyon paternine ilişkin mevcut bilgiler temel olarak mRNA analizine dayanmakta olduğundan, MAGE ailesi üyelerinin protein ekspresyonları hakkında çok az şey bilinmektedir (Jungbluth vd., 2000). Bununla birlikte, MM muhtemelen tüm insan kanserleri arasında en zengin CTA antijen ekspresyonuna sahip malignitedir. MM'da en sık eksprese edilen iki CTA'nın, MAGE-C1 ve MAGE-A3 olduğu ve özellikle MAGE-C1 ekspresyonunun MM prognozu üzerinde güçlü bir etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Atanackovic vd., 2010). MAGE-C1 ve MAGE-A3'ün MM hücre hatlarında shRNA aracılı susturulması ile yapılan farklı bir çalışmada, MAGE-C1 ve MAGE-A3'ün apoptoza aracılık eden kaspaz 3 veya 8'in ekspresyonlarını arttırdığı bildirilmiştir. İlaveten, MAGE-C1 ve MAGE-A3'ün MM sağ kalımında önemli olduğu gösterilmiştir (Atanackovic vd., 2010). Aynı çalışmada, bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgularla paralel olarak, miyelom hücrelerinde CFZ uygulanmasının ardından MAGE-C1 ve MAGE-A3'ün ifadelerinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu nedenle, RPMI8226 ve U266 CFZ dirençli hücre hatlarının kaspaz 3 ve kaspaz 8'den bağımsız direnç mekanizması geliştirmiş olabileceği düşünülmektedir. MAGE-C2'nin hepatokarsinom hücrelerinde TRIM28'e bağlanarak p53 proteininin stabilitesini düzenlediği bildirilmiştir (Doyle vd., 2010). TRIM protein ailesi, hücre proliferasyonu, gelişimi, apoptoz ve ilaç direnci dâhil olmak üzere bir dizi biyolojik süreçte yer alan büyük ve nispeten az anlaşılmış bir protein ailesidir (Hatakeyama, 2017). Çalışmamızda kullanılan MM hücre hatlarından U266 p53 mutasyonuna sahiptir, RPMI 8226'da ise p53 ifadesi bulunmamaktadır. Dolayısıyla, CFZ dirençli bu hücre hatlarında MAGE-C2'nin mRNA seviyesinin azalması Doyle vd.'nin çalışma sonuçlarına paralellik göstermektedir (Doyle vd., 2010). Ayrıca, MAGE-C2'nin melanom hücrelerinin büyümesini ve tümör oluşumunu, ve bu hücrelerde DNA hasar onarımını desteklediği rapor edilmiştir (Bhatia vd., 2013). Çalışmamızda CFZ dirençli MM hücre hatlarında MAGE-C1, C2 ve A3 genlerinin ekspresyon seviyeleri baskılanmıştır. Bu genlerin mRNA ekspresyon seviyelerinin dışında protein ekspresyon seviyelerinde de incelenmesi gerekmektedir.

Kanser hücreleri, hayatta kalmak için biyoenerjetik ve anabolik talepleri karşılamak üzere metabolizmalarını yeniden düzenler (Xiang vd., 2020). MM hücreleri de stres koşulları altında hücre sağ kalımlarını arttırmak için OXPHOS'a bağımlılık gösterir (Xiang vd., 2020). MM'da ilaç direncinin gelişimi aynı zamanda metabolik değişikliklerle de ilişkilidir (Rizzieri vd., 2019). OXPHOS, aerobik solunum için ATP sentezindeki son aşamadır. MM'un ilerlemesi sırasında artan glikoliz sırasında OXPHOS aktivitesinin azaldığı bulunmuştur. Bunun, TCA döngüsünün, OXPHOS mekanizmasının normal bir ATP üretim

hızında çalışmasını sağlamak için yeterli elektron taşıyıcıları üretmediği için meydana geldiği düşünülmektedir. OXPHOS, mitokondriyal krista membranında yer alan kompleks I, II, III, IV ve V olarak adlandırılan beş protein kompleksi tarafından gerçekleştirilir. Bu koşullar göz önüne alındığında, enerji üretimi anaerobik solunuma kaymakta ve laktat miyelom hücrelerinde ana enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. LDH-C geninin, akciğer kanseri, meme kanseri ve melanomda aşırı miktarda eksprese edildiği gösterilmiştir (Chen vd., 2021). Bununla birlikte, LDH-C'nin tümörlerdeki tam fonksiyonel rolü açıklığa kavuşturulamamıştır. LDH-C4 belirli kanser hücre tiplerinde eksprese edilen, ancak normal dokulardaki sadece germline hücrelerinde eksprese edilen CTA'lerden biridir. LDH izozim ailesi, NADH'nin NAD⁺ ile birlikte piruvatın laktata indirgenmesini katalize ederek glikoliz ve ATP oluşumunu teşvik eder (Chen vd., 2021). LDH-C substrat olarak laktatı kullandığından, kanserde LDH-C aktivasyonunun ATP üretimi için laktata bağlı olması muhtemeldir. LDH-C'ye ek olarak, LDH-A meme dokusunda da eksprese edilir ve glikoliz, büyüme özellikleri ve meme kanserinin sürdürülmesinde anahtar rol oynar (Gupta, 2012). LDH-C4'ün pozitif ekspresyonunun, azalan sağ kalım oranı ve kanser vakalarının kötü klinik prognoz riskinin artmasıyla önemli ölçüde ilişkili olduğunu bildirilmiştir (Peng vd., 2022). CFZ dirençli MM hücre hatlarında LDH-C4 gen ifadesinin azalması; LDH-C4 ifadesi ile sağ kalım arasındaki ilişki göz önüne alındığında CFZ dirençli hücrelerde ilaç direnci oluşumunda laktat kullanımının direnç gelişimi ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Mitokondri üzerinde etkili olan KIAA0100 geninin meme karsinom örneklerindeki aşırı ekspresyonu, bu genin meme tümörjenezinde önemli olduğunu işaret etmektedir (Song vd., 2006). Agresif beyin tümörü olan glioblastom hücre hattı olan U937 hücrelerinde KIAA0100 gen ekspresyonunun CRISPR/Cas9 sistemi tarafından başarıyla aşağı regüle edilmesi bu hücrelerde proliferasyonu baskılamış ve apoptozu arttırmıştır (Cui vd., 2017). MM hücrelerinde CFZ uygulanması ile hücre proliferasyon hızının azalması ve hücrelerin apoptoza gitmesi beklenmektedir. Fakat CFZ direnci geliştiren hücrelerde proliferasyon hızı azalmış olmasına rağmen apoptozdan kaçış gözlenmektedir. Bu nedenle, KIAA0100 geninin ekspresyon düzeyinin CFZ dirençli MM hücrelerinde artması beklenirken; bu çalışmada, CFZ hassas hücreler ile karşılaştırıldığında CFZ dirençli MM hücrelerinde KIAA0100 mRNA ekspresyonu azalmıştır. Dolayısıyla, CFZ dirençli MM hücrelerinde KIAA0100 protein miktarının belirlenmesine ve bu genin daha ayrıntılı olarak çalışılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

COX6B2 (Sitokrom c Oksidaz VIb-2), mitokondriyal elektron taşıma zincirinin kompleks IV'ü olan sitokrom c oksidazın (COX) testise özgü bir alt birimidir (Xu vd., 2020).

COX6B2, testisteki spesifik enerji ihtiyaçlarını desteklemek için spermatogenezin tüm adımlarında eksprese edilir ve akciğer adenokarsinomunda OXPHOS ile ilişkili bir gen olarak rol oynar (Cheng vd., 2020). COX6B2'nin aşırı ekspresyonu, sitokrom c oksidaz kompleksi IV'ün aktivitesini indükler ve böylece OXPHOS ve NAD⁺ oluşumunu artırarak ATP üretimine ve dolayısıyla tümör hücresi proliferasyonunda bir artışa yol açar. COX6B2 ifadesinin baskılanması, OXPHOS'ta bir azalmaya ve mitokondriyal membran yıkımı nedeniyle apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (Yang vd., 2022). COX6B2'nin PDAC hücrelerinde aşırı ekspresyonu, bu hücrelerde proliferasyonu ve metastazı arttırmıştır (Nie vd., 2020). Bununla birlikte, COX6B2 kaybı şaşırtıcı bir şekilde hücre apoptozunu indüklemiştir (Cheng vd., 2020). Bu nedenle, COX6B2'nin biyolojik rolünün, hücre tipine özgü olabileceği görülmektedir (Maxfield vd., 2015).

SPATA19 haploid spermatidlerde ifade edilen, N-terminalinde bir mitokondri hedefleme sinyali olan 154 amino asitlik küçük bir proteindir (Mi vd., 2015). Spermatogenez sırasında SPATA19, yuvarlak spermatidlerde ve sperm kuyruğunun orta kısmında eksprese edilir. Bir germ hücresine özgü SPATA19 ifadesi olmayan (-/-) farelerin incelenmesi, bu proteinin uygun kamçı oluşumu ve sperm hareketliliği için gerekli olduğunu, sperm başı ve nükleer DNA bütünlüğü koruduğunu ortaya koymuştur (Yamashita vd., 2002). Bu nedenle SPATA19'un mitokondrinin organizasyonu ve/veya işlevine dahil olabileceği varsayılmaktadır (Doiguchi vd., 2002). Bu gendeki değişikliklerin, mitokondriyal krista düzensizliği ve ATP üretiminin azalmasına yol açtığı vurgulanmaktadır (Aurrière vd., 2021). Prostat kanserinde ve bazal hücreli karsinomda SPATA19 ekspresyonu kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur (Ghafouri-Fard vd., 2010). Bu nedenle SPATA19'un doğrudan veya dolaylı olarak COX1 ve COX4 d ekspresyonunu düzenlenmesiyle sitokrom c oksidaz oluşumunda önemli bir rol oynayabileceği belirtilmiştir (Mi vd., 2015). Çalışmamızda, SPATA19'un CFZ dirençli RPMI 8226 hücrelerinde ifade edilmediği; U266 hücrelerinde ise mRNA seviyesi azalmıştır. MM hücrelerinde mitokondri metabolizması hücre sağ kalımında önemli rol oynadığından, CFZ dirençli hücrelerde SPATA19 protein seviyesinin ve genetik manipülasyon yoluyla SPATA19'un fonksiyonel görevinin anlaşılması önem arz etmektedir.

Özet olarak, CFZ'e karşı hassas U266 ve RPMI 8226 hücrelerine kıyasla, CFZ'e karşı direnç geliştirilen U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-A3, COX6B2, KIAA0100, LDH-C4 ve SPATA19 genlerinin ekspresyon düzeyleri azalmıştır. Sonuç olarak, CFZ'e karşı oluşan dirençte ilgili genlerin protein seviyelerinin ve

protein stabilizasyonunda görevli mekanizmaların ayrıntılı çalışılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.



5. SONUÇ

Bu tez çalışmasında;

- CFZ dirençli MM hücre hatlarında ilk kez MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-A3, COX6B2, KIAA0100, LDH-C4 ve SPATA19 gen ekspresyon düzeyleri qPCR yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.
- Özellikle, mitokondri üzerine etkileri olan COX6B2, KIAA0100, LDH-C4 ve SPATA19'un gen ekspresyon seviyeleri ilk kez MM hücre hatlarında çalışılmış olup, bu konu hakkında literatürde bir araştırmaya rastlanılmamıştır.
- CFZ hassas U266 hücrelerine kıyasla, CFZ dirençli U266 hücrelerinde MAGE-C1 mRNA ekspresyonu tespit edilememiş, MAGE-C2, MAGE-A3, COX6B2, LDH-C4 ve SPATA19 gen ekspresyon seviyeleri ise düşük bulunmuştur.
- CFZ hassas RPMI 8226 hücrelerine kıyasla, CFZ dirençli RPMI 8226 hücrelerinde MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-A3, COX6B2, LDH-C4 ve KIAA0100 mRNA seviyeleri önemli ölçüde azalmıştır. Bununla birlikte, RPMI 8266 hücrelerinde mitokondride etkili SPATA19 geninin ekspresyonu tespit edilememiştir.
- Fizyolojik koşullar altında ekspresyonu testis ile sınırlı olan ancak birçok kanser çeşitlerinde ekspresyonu artan ilgili CTA'ların CFZ direnci geliştirilen MM hücrelerinde protein seviyede araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abraham, J., Salama, N. N., ve Azab, A. K. 2015. The role of P-glycoprotein in drug resistance in multiple myeloma. *Leukemia and Lymphoma*, 56,1, 26–33.
- Al Mamun, A., Uddin, M. S., Kabir, M. T., Khanum, S., Sarwar, M. S., Mathew, B., Rauf, A., Ahmed, M., ve Ashraf, G. M. 2020. Exploring the Promise of Targeting Ubiquitin-Proteasome System to Combat Alzheimer’s Disease. *Neurotoxicity Research*, 38,1, 8–17.
- Arnoult, N., ve Karlseder, J. 2014. ALT Telomeres borrow from meiosis. *Cell*, 159,1, 11.
- Atanackovic, D., Arfsten, J., Cao, Y., Gnjatic, S., Schnieders, F., Bartels, K., Schilling, G., Faltz, C., Wolschke, C., Dierlamm, J., Ritter, G., Eiermann, T., Hossfeld, D. K., Zander, A. R., Jungbluth, A. A., Old, L. J., Bokemeyer, C., ve Kröger, N. 2007. Cancer-testis antigens are commonly expressed in multiple myeloma and induce systemic immunity following allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, 109,3, 1103–1112.
- Atanackovic, D., Hildebrandt, Y., Jadcak, A., Cao, Y., Luetkens, T., Meyer, S., Kobold, S., Bartels, K., Pabst, C., Lajmi, N., Gordic, M., Stahl, T., Zander, A. R., Bokemeyer, C., ve Kröger, N. 2010. Cancer-testis antigens MAGE-C1/CT7 and MAGE-A3 promote the survival of multiple myeloma cells. *Haematologica*, 95,5, 785–793.
- Autrière, J., Goudenège, D., Baris, O. R., Boguenet, M., May-Panloup, P., Lenaers, G., ve Khiati, S. 2021. Cancer/Testis Antigens into mitochondria: a hub between spermatogenesis, tumorigenesis and mitochondrial physiology adaptation. *Mitochondrion*, 56, 73–81.
- Bachiller, S., Alonso-bellido, I. M., Real, L. M., Pérez-villegas, E. M., Venero, J. L., Deierborg, T., Armengol, J. Á., ve Ruiz, R. 2020. The Ubiquitin Proteasome System in Neuromuscular Disorders: Moving Beyond Movement. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, 21,17, 6429.
- Barrio, S., Stühmer, T., Da-Viá, M., Barrio-Garcia, C., Lehnert, N., Besse, A., Cuenca, I., Garitano-Trojaola, A., Fink, S., Leich, E., Chatterjee, M., Driessen, C., Martinez-Lopez, J., Rosenwald, A., Beckmann, R., Bargou, R. C., Braggio, E., Stewart, A. K., Raab, M. S., ... Kortüm, K. M. 2019. Spectrum and functional validation of PSMB5 mutations in multiple myeloma. *Leukemia*, 33,2, 447–456.
- Berenson, J. R., Hilger, J. D., Yellin, O., Dichmann, R., Patel-Donnelly, D., Boccia, R. V.,

- Bessudo, A., Stampleman, L., Gravenor, D., Eshaghian, S., Nassir, Y., Swift, R. A., ve Vescio, R. A. 2014. Replacement of bortezomib with carfilzomib for multiple myeloma patients progressing from bortezomib combination therapy. *Leukemia*, 28,7, 1529–1536.
- Besse, A., Stolze, S. C., Rasche, L., Weinhold, N., Morgan, G. J., Kraus, M., Bader, J., Overkleeft, H. S., Besse, L., ve Driessen, C. 2018. Carfilzomib resistance due to ABCB1/MDR1 overexpression is overcome by nelfinavir and lopinavir in multiple myeloma. *Leukemia*, 32,2, 391–401.
- Bhatia, N., Xiao, T. Z., Rosenthal, K. A., Siddiqui, I. A., Thiyagarajan, S., Smart, B., Meng, Q., Zuleger, C. L., Mukhtar, H., Kenney, S. C., Albertini, M. R., ve Jack Longley, B. 2013. MAGE-C2 promotes growth and tumorigenicity of melanoma cells, phosphorylation of KAP1, and DNA damage repair. *Journal of Investigative Dermatology*, 133,3, 759–767.
- Bloedjes, T. A., de Wilde, G., ve Guikema, J. E. J. 2021. Metabolic Effects of Recurrent Genetic Aberrations in Multiple Myeloma. *Cancers* 2021, 13,3, 396.
- Bode, P. K., Thielken, A., Brandt, S., Barghorn, A., Lohe, B., Knuth, A., ve Moch, H. 2014. Cancer testis antigen expression in testicular germ cell tumorigenesis. *Modern Pathology*, 27,6, 899–905.
- Breznik, B., Motaln, H., ve Turnšek, T. L. 2017. Proteases and cytokines as mediators of interactions between cancer and stromal cells in tumours. *Biological Chemistry*, 398,7, 709–719.
- Brünnert, D., Kraus, M., Stühmer, T., Kirner, S., Heiden, R., Goyal, P., Driessen, C., Bargou, R. C., ve Chatterjee, M. 2019. Novel cell line models to study mechanisms and overcoming strategies of proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma. *Biochimica et Biophysica Acta ,BBA, - Molecular Basis of Disease*, 1865,6, 1666–1676.
- Caballero, O. L., ve Chen, Y. T. 2009. Cancer/testis ,CT, antigens: Potential targets for immunotherapy. *Cancer Science*, 100,11, 2014–2021.
- Cardona-benavides, I. J., de Ramón, C., ve Gutiérrez, N. C. 2021. Genetic Abnormalities in Multiple Myeloma: Prognostic and Therapeutic Implications. *Cells* 2021, 10,2, 336.
- Cheng, Y.-H., Wong, E. W. P., ve Cheng, C. Y. 2011. Cancer/testis ,CT, antigens, carcinogenesis and spermatogenesis. *Spermatogenesis*, 1,3, 209–220.
- Colombo, M., Galletti, S., Garavelli, S., Platonova, N., Paoli, A., Basile, A., Taiana, E., Neri, A., ve Chiaramonte, R. 2015. Notch signaling deregulation in multiple myeloma: A rational molecular target. *Oncotarget*, 6,29, 26826–26840.

- Cui, H., Lan, X., Lu, S., Zhang, F., ve Zhang, W. 2017. Bioinformatic prediction and functional characterization of human KIAA0100 gene. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 7,1, 10–18.
- Davis, L. N., ve Sherbenou, D. W. 2021. Emerging Therapeutic Strategies to Overcome Drug Resistance in Multiple Myeloma. *Cancers* 2021, 13,7, 1686.
- Doyle, J. M., Gao, J., Wang, J., Yang, M., ve Potts, P. R. 2010. MAGE-RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases. *Molecular Cell*, 39,6, 963–974.
- Dutta, A. K., Hewett, D. R., Fink, J. L., Grady, J. P., ve Zannettino, A. C. W. 2017. Cutting edge genomics reveal new insights into tumour development, disease progression and therapeutic impacts in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 178,2, 196–208.
- Fratta, E., Coral, S., Covre, A., Parisi, G., Colizzi, F., Danielli, R., Marie Nicolay, H. J., Sigalotti, L., ve Maio, M. 2011. The biology of cancer testis antigens: Putative function, regulation and therapeutic potential. *Molecular Oncology*, 5,2, 164–182.
- Ghafouri-Fard, S., Abbasi, A., Moslehi, H., Faramarzi, N., Taba Taba Vakili, S., Mobasheri, M. B., ve Modarressi, M. H. 2010. Elevated expression levels of testis-specific genes TEX101 and SPATA19 in basal cell carcinoma and their correlation with clinical and pathological features. *British Journal of Dermatology*, 162,4, 772–779.
- Gjerstorff, M. F., Andersen, M. H., ve Ditzel, H. J. 2015. Oncogenic cancer/testis antigens: prime candidates for immunotherapy. *Oncotarget*, 6,18, 15772.
- Gjerstorff, M. F., Kock, K., Nielsen, O., ve Ditzel, H. J. 2007. MAGE-A1, GAGE and NY-ESO-1 cancer/testis antigen expression during human gonadal development. *Human Reproduction*, 22,4, 953–960.
- Gordeeva, O. 2018. Cancer-testis antigens: Unique cancer stem cell biomarkers and targets for cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology*, 53, 75–89.
- Gu, C., Jing, X., Holman, C., Sompallae, R., Zhan, F., Tricot, G., Yang, Y., ve Janz, S. 2018. Upregulation of FOXM1 leads to diminished drug sensitivity in myeloma. *BMC Cancer*, 18,1,.
- Gupta, G. S. 2012. LDH-C4: A target with therapeutic potential for cancer and contraception. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 371,1–2, 115–127.
- Harnoss, J. M., Le Thomas, A., Shemorry, A., Marsters, S. A., Lawrence, D. A., Lu, M., Chen, Y. C. A., Qing, J., Totpal, K., Kan, D., Segal, E., Merchant, M., Reichelt, M., Wallweber, H. A., Wang, W., Clark, K., Kaufman, S., Beresini, M. H., Laing, S. T., ... Ashkenazi, A. 2019. Disruption of IRE1 α through its kinase domain attenuates multiple

- myeloma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116,33, 16420–16429.
- Hashimoto, K., Nishimura, S., Ito, T., ve Akagi, M. 2022. Clinicopathological Assessment of Cancer/Testis Antigens NY-ESO-1 and MAGE-A4 in Highly Aggressive Soft Tissue Sarcomas. *Diagnostics* 2022, 12,3, 733.
- Hawley, T. S., Riz, I., Yang, W., Wakabayashi, Y., Depalma, L., Chang, Y. T., Peng, W., Zhu, J., ve Hawley, R. G. 2013. Identification of an ABCB1 ,P-glycoprotein,-positive carfilzomib-resistant myeloma subpopulation by the pluripotent stem cell fluorescent dye CDy1. *American Journal of Hematology*, 88,4, 265–272.
- Hofmann, O., Caballero, O. L., Stevenson, B. J., Chen, Y. T., Cohen, T., Chua, R., Maher, C. A., Panji, S., Schaefer, U., Kruger, A., Lehtvaslaiho, M., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Jongeneel, C. V., Simpson, A. J. G., Old, L. J., ve Hide, W. 2008. Genome-wide analysis of cancer/testis gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105,51, 20422–20427.
- Hosoya, N., Okajima, M., Kinomura, A., Fujii, Y., Hiyama, T., Sun, J., Tashiro, S., ve Miyagawa, K. 2012. Synaptonemal complex protein SYCP3 impairs mitotic recombination by interfering with BRCA2. *EMBO Reports*, 13,1, 44.
- Jungbluth, A. A., Ely, S., DiLiberto, M., Niesvizky, R., Williamson, B., Frosina, D., Chen, Y. T., Bhardwaj, N., Chen-Kiang, S., Old, L. J., ve Cho, H. J. 2005. The cancer-testis antigens CT7 ,MAGE-C1, and MAGE-A3/6 are commonly expressed in multiple myeloma and correlate with plasma-cell proliferation. *Blood*, 106,1, 167–174.
- Kalejs, M., ve Erenpreisa, J. 2005. Cancer/testis antigens and gametogenesis: A review and brain-storming session. *Cancer Cell International*, 5.
- Kitajima, Y., Suzuki, N., Nunomiya, A., Osana, S., Yoshioka, K., Tashiro, Y., Takahashi, R., Ono, Y., Aoki, M., ve Nagatomi, R. 2018. The Ubiquitin-Proteasome System Is Indispensable for the Maintenance of Muscle Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 11,6, 1523–1538.
- Kohlmann, A., Grossmann, V., Nadarajah, N., ve Haferlach, T. 2013. Next-generation sequencing - feasibility and practicality in haematology. *British Journal of Haematology*, 160,6, 736–753.
- Kortüm, K. M., Mai, E. K., Hanafiah, N. H., Shi, C. X., Zhu, Y. X., Bruins, L., Barrio, S., Jedlowski, P., Merz, M., Xu, J., Stewart, R. A., Andrulis, M., Jauch, A., Hillengass, J., Goldschmidt, H., Bergsagel, P. L., Braggio, E., Stewart, A. K., ve Raab, M. S. 2016. Targeted sequencing of refractory myeloma reveals a high incidence of mutations in

- CRBN and Ras pathway genes. *Blood*, 128,9, 1226–1233.
- Kulkarni, P., ve Uversky, V. N. 2017. Cancer/testis antigens: smart biomarkers for diagnosis and prognosis of prostate and other cancers. *Int. J. Mol. Sci.*, 18,4, 740.
- Kumar, S. K., Lee, J. H., Lahuerta, J. J., Morgan, G., Richardson, P. G., Crowley, J., Haessler, J., Feather, J., Hoering, A., Moreau, P., Leleu, X., Hulin, C., Klein, S. K., Sonneveld, P., Siegel, D., Bladé, J., Goldschmidt, H., Jagannath, S., Miguel, J. S., ... Durie, B. G. M. 2012. Risk of progression and survival in multiple myeloma relapsing after therapy with IMiDs and bortezomib: A multicenter international myeloma working group study. *Leukemia*, 26,1, 149–157.
- Laduron, S., Deplus, R., Zhou, S., Kholmanskikh, O., Godelaine, D., De Smet, C., Hayward, S. D., Fuks, F., Boon, T., ve De Plaen, E. 2004. MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription. *Nucleic Acids Research*, 32,14, 4340–4350.
- Lecker, S. H., Goldberg, A. L., ve Mitch, W. E. 2006. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17,7, 1807–1819.
- Leonardo-sousa, C., Carvalho, A. N., Guedes, R. A., Fernandes, P. M. P., Aniceto, N., Salvador, J. A. R., Gama, M. J., ve Guedes, R. C. 2022. Revisiting Proteasome Inhibitors: Molecular Underpinnings of their Development, Mechanisms of Resistance and Strategies to Overcome Anti-Cancer Drug Resistance. *Molecules*, 27,7, 2201.
- Leung-Hagesteijn, C., Erdmann, N., Cheung, G., Keats, J. J., Stewart, A. K., Reece, D. E., Chung, K. C., ve Tiedemann, R. E. 2013. Xbp1s-Negative Tumor B Cells and Pre-Plasmablasts Mediate Therapeutic Proteasome Inhibitor Resistance in Multiple Myeloma. *Cancer Cell*, 24,3, 289–304.
- Levin, N., Spencer, A., Harrison, S. J., Chauhan, D., Burrows, F. J., Anderson, K. C., Reich, S. D., Richardson, P. G., ve Trikha, M. 2016. Marizomib irreversibly inhibits proteasome to overcome compensatory hyperactivation in multiple myeloma and solid tumour patients. *British Journal of Haematology*, 174,5, 711–720.
- Lie, P. P. Y., Cheng, C. Y., ve Mruk, D. D. 2013. SIGNALING PATHWAYS REGULATING THE BLOOD-TESTIS BARRIER. *The International Journal of Biochemistry ve Cell Biology*, 45,3, 621.
- Madisson, E., Töhönen, V., Vesterlund, L., Katayama, S., Unneberg, P., Inzunza, J., Hovatta, O., ve Kere, J. 2014. Differences in gene expression between mouse and human for dynamically regulated genes in early embryo. *PLoS ONE*, 9,8,.

- Maes, A., Menu, E., de Veirman, K., Maes, K., Vanderkerken, K., ve de Bruyne, E. 2017. The therapeutic potential of cell cycle targeting in multiple myeloma. In *Oncotarget* , 8, Issue 52, pp. 90501–90520,. Impact Journals LLC.
- Manasanch, E. E., ve Orlowski, R. Z. 2017. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2017 , 14,7, 417–433.
- Mata-Cantero, L., Lobato-Gil, S., Aillet, F., Lang, V., ve Rodriguez, M. S. 2015. The ubiquitin-proteasome system ,UPS, as a cancer drug target: Emerging mechanisms and therapeutics. *Stress Response Pathways in Cancer: From Molecular Targets to Novel Therapeutics*, 225–264.
- Maxfield, K. E., Taus, P. J., Corcoran, K., Wooten, J., MacIon, J., Zhou, Y., Borromeo, M., Kollipara, R. K., Yan, J., Xie, Y., Xie, X. J., ve Whitehurst, A. W. 2015b. Comprehensive functional characterization of cancer–testis antigens defines obligate participation in multiple hallmarks of cancer. *Nature Communications* 2015, 6,1, 1–15.
- Mita, P., Hinton, B. T., ve Dufour, J. M. 2011. The Blood-Testis and Blood-Epididymis Barriers Are More than Just Their Tight Junctions. *Biology of Reproduction*, 84,5, 851.
- Morgan, G. J., Walker, B. A., ve Davies, F. E. 2012a. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nature Reviews Cancer* 2012, 12,5, 335–348.
- Nijhof, I. S., Groen, R. W. J., Lokhorst, H. M., Van Kessel, B., Bloem, A. C., Van Velzen, J., De Jong-Korlaar, R., Yuan, H., Noort, W. A., Klein, S. K., Martens, A. C. M., Doshi, P., Sasser, K., Mutis, T., ve Van De Donk, N. W. C. J. 2015. Upregulation of CD38 expression on multiple myeloma cells by all-trans retinoic acid improves the efficacy of daratumumab. *Leukemia*, 29,10, 2039–2049.
- O'Connor, R., Ooi, M. G., Meiller, J., Jakubikova, J., Klippel, S., Delmore, J., Richardson, P., Anderson, K., Clynes, M., Mitsiades, C. S., ve O'Gorman, P. 2013. The interaction of bortezomib with multidrug transporters: Implications for therapeutic applications in advanced multiple myeloma and other neoplasias. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 71,5, 1357–1368.
- O'Donnell, L., Rebourcet, D., Dagley, L. F., Sgaier, R., Infusini, G., O'Shaughnessy, P. J., Chalmel, F., Fietz, D., Weidner, W., Legrand, J. M. D., Hobbs, R. M., McLachlan, R. I., Webb, A. I., Pilatz, A., Diemer, T., Smith, L. B., ve Stanton, P. G. 2021. Sperm proteins and cancer-testis antigens are released by the seminiferous tubules in mice and men. *FASEB Journal*, 35,3,.
- Padala, S. A., Barsouk, A., Barsouk, A., Rawla, P., Vakiti, A., Kolhe, R., Kota, V., ve Ajebo, G. H. 2021. Epidemiology, Staging, and Management of Multiple Myeloma. *Medical*

Sciences 2021, 9,1, 3.

- Palumbo, A., Avet-Loiseau, H., Oliva, S., Lokhorst, H. M., Goldschmidt, H., Rosinol, L., Richardson, P., Caltagirone, S., Lahuerta, J. J., Facon, T., Bringhen, S., Gay, F., Attal, M., Passera, R., Spencer, A., Offidani, M., Kumar, S., Musto, P., Lonial, S., ... Moreau, P. 2015. Revised international staging system for multiple myeloma: A report from international myeloma working group. *Journal of Clinical Oncology*, 33,26, 2863–2869.
- Park, J., Cho, J., ve Song, E. J. 2020a. Ubiquitin–proteasome system ,UPS, as a target for anticancer treatment. *Archives of Pharmacal Research* 2020, 43,11, 1144–1161.
- Parmigiani, R. B., Bettoni, F., Grosso, D. M., Lopes, A., Cunha, I. W., Soares, F. A., Carvalho, A. L., Fonseca, F., ve Camargo, A. A. 2008. Antibodies against the cancer-testis antigen CTSP-1 are frequently found in prostate cancer patients and are an independent prognostic factor for biochemical-recurrence. *International Journal of Cancer*, 122,10, 2385–2390.
- Pawlyn, C., ve Morgan, G. J. 2017. Evolutionary biology of high-risk multiple myeloma. In *Nature Reviews Cancer* , 17, Issue 9, pp. 543–556,. Nature Publishing Group.
- Prideaux, S. M., Conway O'Brien, E., ve Chevassut, T. J. 2014. The genetic architecture of multiple myeloma. In *Advances in Hematology* , 2014,. Hindawi Publishing Corporation.
- Qiang, Y. W., Ye, S., Chen, Y., Buros, A. F., Edmonson, R., Van Rhee, F., Barlogie, B., Epstein, J., Morgan, G. J., ve Davies, F. E. 2016. MAF protein mediates innate resistance to proteasome inhibition therapy in multiple myeloma. *Blood*, 128,25, 2919–2930.
- Rivera, M., Wu, Q., Hamerlik, P., Hjelmeland, A. B., Bao, S., ve Rich, J. N. 2015. Acquisition of meiotic DNA repair regulators maintain genome stability in glioblastoma. *Cell Death and Disease*, 6,4,.
- Robak, P., Drozd, I., Szemraj, J., ve Robak, T. 2018. Drug resistance in multiple myeloma. *Cancer Treatment Reviews*, 70, 199–208.
- Saltarella, I., Lamanuzzi, A., Reale, A., Vacca, A., ve Ria, R. 2015. Identify multiple myeloma stem cells: Utopia?. *World Journal of Stem Cells*, 7,1, 84.
- Sherman, D. J., ve Li, J. 2020. Proteasome Inhibitors: Harnessing Proteostasis to Combat Disease. *Molecules* 2020, 25, 3, 671.
- Shires, K., ve Van Wyk, T. 2018. The role of Cancer/Testis Antigens in Multiple Myeloma pathogenesis and their application in disease monitoring and therapy. *Critical Reviews*

- in *Oncology/Hematology*, 132, 17–26.
- Shires, K., van Wyk, T., ve Wienand, K. 2021. The expression of multiple cancer/testis antigens can potentially be used to detect circulating disease and clonal evolution in the peripheral blood of multiple myeloma patients. *Blood Research*, 56,3, 156–165.
- Soriano, G. P., Besse, L., Li, N., Kraus, M., Besse, A., Meeuwenoord, N., Bader, J., Everts, B., Den Dulk, H., Overkleeft, H. S., Florea, B. I., ve Driessen, C. 2016. Proteasome inhibitor-adapted myeloma cells are largely independent from proteasome activity and show complex proteomic changes, in particular in redox and energy metabolism. *Leukemia*, 30,11, 2198–2207.
- Taylor, B. J., Reiman, T., Pittman, J. A., Keats, J. J., De Bruijn, D. R. H., Mant, M. J., Belch, A. R., ve Pilarski, L. M. 2005. SSX cancer testis antigens are expressed in most multiple myeloma patients: Co-expression of SSX1, 2, 4, and 5 correlates with adverse prognosis and high frequencies of SSX-positive PCs. *Journal of Immunotherapy*, 28,6, 564–575.
- Türeci, Ö., Sahin, U., Zwick, C., Koslowski, M., Seitz, G., ve Pfreundschuh, M. 1998. Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95,9, 5211.
- Van Der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van Den Eynde, B., Knuth, A., ve Boon, T. 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 254,5038, 1643–1647.
- van Duin, M., Broyl, A., de Knecht, Y., Goldschmidt, H., Richardson, P. G., Hop, W. C. J., van der Holt, B., Joseph-Pietras, D., Mulligan, G., Neuwirth, R., Sahota, S. S., ve Sonneveld, P. 2011. Cancer testis antigens in newly diagnosed and relapse multiple myeloma: Prognostic markers and potential targets for immunotherapy. *Haematologica*, 96,11, 1662–1669.
- Wang, D., Hildorf, S., Ntemou, E., Dong, L., Pors, S. E., Mamsen, L. S., Fedder, J., Hoffmann, E. R., Clasen-Linde, E., Cortes, D., Thorup, J., ve Andersen, C. Y. 2022. Characterization and Survival of Human Infant Testicular Cells After Direct Xenotransplantation.. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 853482.
- Wang, J., Fang, Y., Andrea Fan, R., ve Kirk, C. J. 2021. Proteasome Inhibitors and Their Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22,21, 11595.
- Wester, R., Van Der Holt, B., Asselbergs, E., Zweegman, S., Kersten, M. J., Vellenga, E., Van Marwijk Kooy, M., De Weerd, O., Minnema, M., Lonergan, S., Palumbo, A.,

- Lokhorst, H., Broijl, A., ve Sonneveld, P. 2019. Phase II study of carfilzomib, thalidomide, and low-dose dexamethasone as induction and consolidation in newly diagnosed, transplant eligible patients with multiple myeloma; the Carthadex trial. *Haematologica*, 104,11, 2265.
- Whitehurst, A. W. 2014. Cause and Consequence of Cancer/Testis Antigen Activation in Cancer. <http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev-Pharmtox-011112-140326>, 54, 251–272.
- Wu, Y. X., Yang, J. H., ve Saitsu, H. 2016. Bortezomib-resistance is associated with increased levels of proteasome subunits and apoptosis-avoidance. *Oncotarget*, 7,47, 77622–77634.
- Xu, H., Han, H., Song, S., Yi, N., Qian, C., Qiu, Y., Zhou, W., Hong, Y., Zhuang, W., Li, Z., Li, B., ve Zhuang, W. 2019. Exosome-transmitted PSMA3 and PSMA3-AS1 promote proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma. *Clinical Cancer Research*, 25,6, 1923–1935.
- Yang, F., Zhou, X., Miao, X., Zhang, T., Hang, X., Tie, R., Liu, N., Tian, F., Wang, F., ve Yuan, J. 2014. MAGEC2, an epithelial-mesenchymal transition inducer, is associated with breast cancer metastasis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 145,1, 23–32.
- Yang, P., Qiao, Y., Meng, M., ve Zhou, Q. 2022. Cancer/Testis Antigens as Biomarker and Target for the Diagnosis, Prognosis, and Therapy of Lung Cancer. *Frontiers in Oncology*, 12.
- Young, M. J., Hsu, K. C., Lin, T. E., Chang, W. C., ve Hung, J. J. 2019. The role of ubiquitin-specific peptidases in cancer progression. *Journal of Biomedical Science*, 26,1,.
- Zhu, H., Wang, J., Yin, J., Lu, B., Yang, Q., Wan, Y., ve Jia, C. 2018. Downregulation of PRAME Suppresses Proliferation and Promotes Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Through the Activation of P53 Mediated Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 45,3, 1121–1135.

1-
2-



