



T.C.

**AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HSP27 İNHİBİTÖRÜ BRİVUDİN'İN BORTEZOMİBLE
BİRLİKTE MULTİPLE MYELOMA TEDAVİSİNDE
KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşegül TETİK

DANIŞMAN

Prof. Dr. Kamile ÖZTÜRK

AKSARAY, 2022



T.C.

**AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HSP27 İNHİBİTÖRÜ BRİVUDİN'İN BORTEZOMİBLE
BİRLİKTE MULTİPLE MYELOMA TEDAVİSİNDE
KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşegül TETİK

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Kamile ÖZTÜRK**

AKSARAY, 2022

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 182307008 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi, Ayşegül TETİK, tarafından hazırlanan “**HSP27 İNHİBİTÖRÜ BRİVUDİN’İN BORTEZOMİBLE BİRLİKTE MULTİPLE MYELOMA TEDAVİSİNDE KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile Fen Bilimleri Eğitimi Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Kamile ÖZTÜRK

Aksaray Üniversitesi

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

Jüri Üyesi: Prof Dr. Taner ÖZGÜRTAŞ

Sağlık Bilimleri Üniveritesi

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

Jüri Üyesi: Doç. Dr. Emine ÖKSÜZOĞLU

Aksaray Üniversitesi

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

Tez Savunma Tarihi: 01/07/2022

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

.....

Doç. Dr. Mehmet Ali HINIS

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOĞRULUK BEYANI

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

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

Ayşegül TETİK

TEŞEKKÜR

Aldığım uzun soluklu Yüksek Lisans eğitimimde desteğini bir an olsun esirgemeyen, gece gündüz demeden her an yanımda olan, öğretme ve ilerleme azmiyle bizleri bilimin ışığında en donanımlı şekilde yetiştirmeye çalışan, şartlar ne kadar zor yollar ne kadar uzun olsa da bıkmadan usanmadan öğrencisinden vazgeçmeyen ve deneysel çalışmalarımı gerçekleştirdiğim sevgili danışman hocam Sayın Prof. Dr. Kamile ÖZTÜRK'e,

Deneysel çalışmalarım esnasında eksik malzemelerimi temin etmemde büyük bir içtenlikle yardım eden Öğretim görevlisi Sayın Neslihan TEKİN KARACA hocama,

Çalışmalarım boyunca güleryüzünü esirgemeyen ve deneysel kısımlarda yol gösteren Öğretim Görevlisi Tuğçe KARADUMAN'a ve Mehtap TARHAN'a

Beni her zaman destekleyen ve yanımda olan başaracağımdan hiçbir zaman şüphe etmeyen biricik annem Hayriye TETİK, hakkını ödeyemeyeceğim babam Şevki TETİK ve kardeşim Alpaslan TETİK'e

Tez çalışmamı bitirmem için beni yüreklendiren ve destekleyen başta Emniyet Ailesine sıralı amirlerime, memurlarıma, tüm mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayşegül TETİK
AKSARAY, 2022

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETİ	4
2.1 Multiple Myeloma (MM)	4
2.2 MM Sitogenetiği.....	5
2.3 MM Gelişimi	6
2.4 MM Tanısı	6
2.5 MM'nin Tedavisi.....	8
2.6 MM' da Yeni Tedavi Seçeneklerinin Araştırılması	9
2.6.1 Bortezomib	9
2.7 MM ve ER Stres	10
2.8 ER Stresine Karşı Katlanmamış Protein Cevabı (UPR)	12
2.8.1 ER stresine karşı ubikutin proteazom sistemi (UPS).....	13
2.8.2 ER stresi ve ısı şok proteinleri (HSP).....	14
2.9 Isı Şok Proteinleri (HSP).....	14
2.9.1 Isı Şok Faktörleri	14
2.10 Isı Şok protein Ailesi (HSP).....	15
2.10.1 Büyük molekül ağırlıklı HSP'ler	16
2.10.1.1 HSP110	17
2.10.1.2 HSP 90	17
2.10.1.3 HSP 70	18
2.10.1.4 HSP 60	20
2.10.1.5 HSP 40	20
2.10.2 Küçük molekül ağırlığına sahip sHSPler	19
2.10.2.1 HSP27'nin(HSPB1) yapı ve fonksiyonu.....	22
2.10.2.2 HSP27 ve apoptosis	23
2.10.2.3 HSP27'nin kanserdeki rolü	25
2.10.2.4 HSP27 inhibitörleri ve kanser tedavisi	26
2.10.2.5 Brivudine	27
3. MALZEME VE YÖNTEM	27
3.1 Kullanılan Kimyasallar, Reaktifler ve Genler	27
3.2 Hücre Hatlarının Çoğaltılması.....	27
3.3 Hücre Hatlarının Dondurulması	28
3.4 Hücre Canlılığının Saptanması.....	28
3.5 Sitotoksitenin Belirlenmesi (MTT Test)	29
3.5.1 Bortezomib uygulanması	30
3.5.2 Brivudine uygulanması	30
3.5.3 Kombine ilaç uygulanması	31
3.6 RNA İzolasyonu	32
3.7 Agaroz Jel Elektroforezi.....	33
3.8 cDNA Sentezi (Reverse Transkripsiyon Reaksiyonu)	33
3.9 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real time-PCR)	34

3.10 İstatistiksel Analizler	37
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	38
4.1 Hücre Hatlarının Çoğaltılması.....	38
4.2 Hücre Canlılığının Saptanması (Sitotoksite Test)	39
4.3 Bortezomibin U266 ve RPMI-8226 Hücre Hatlarındaki Sitotoksitesi.....	40
4.4 Brivudine Uygulanması.....	43
4.5 Kombine Çalışma	46
4.6 HSP27 Gen İfade Düzeyinin Saptanması.....	49
4.6.1 Total RNA izolasyonu	49
4.6.2 cDNA sentez sonuçları	49
4.6.3 Real time qPCR sonuçları.....	51
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	55
KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ.....	67



YÜKSEK LİSANS TEZİ

HSP27 İNHİBİTÖRÜ BRİVUDİN'İN BORTEZOMİBLE BİRLİKTE MULTİPLE MYELOMA TEDAVİSİNDE KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayşegül TETİK

Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kamile ÖZTÜRK

ÖZET

Multiple myeloma (MM) fonksiyonel olmayan monoklonal immunoglobulin üretiminden sorumlu malign plazma hücrelerinin kemik iliğinde birikmesiyle karakterize edilen hematolojik bir kanserdir. Son yıllarda myeloma hücrelerinde aşırı üretildiği rapor edilen ısı şok protein ailesinin küçük üyesi HSP27 şaperonun hem MM patogeneğinde hem de tedaviye direnç gelişmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Myeloma tedavisinde özellikle bortezomib gibi proteasome inhibitörleri ile büyük ilerlemeler kaydedilmesine karşın, MM kinikte halen tam olarak tedavi edilemeyen bir kanser türüdür. Bu çalışmanın amacı klinikte antiviral tedavi için kullanılan biruvudin'in bortezomible birlikte myeloma tedavisinde kullanılabilişliğini araştırmaktır.

Bu amaç için brivudin (BRVD) ve bortezomibin (BZM) tek başına ve kombine olarak U266 ve RPMI-8226 insan myeloma hücre hatlarındaki sitotoksiteleri MTT test kullanarak saptandı. BZM ve BRVD'nin her iki hücre hattında 48 saatteki IC50 dozları hesaplandı. BZM'in IC50 dozunda sabit, BRVD konsantrasyonunun değiştirildiği kombine ilaç uygulamalarının U266 ve RPMI-8226 hücre hatlarındaki sitotoksitesi belirlendi. BZM-BRVD etkileşimini değerlendirmek için kombinasyon indeks (CI) analizi yapıldı. Ayrıca BRVD ve BZM uygulamasının U266 ve RPMI-8226 hücre hatlarında HSP27 gen ifadesi üzerine etkisi real time RT-PCR yöntemi kullanarak araştırıldı.

Sonuçta BRVD'nin IC50 değeri 48 saat için U266 ve RPMI-8226 hücre hatlarında sırasıyla 24.39 µM ve 18,83 µM olarak bulundu. BZM'in IC50 değeri ise 48 saat için U266 ve RPMI-8226 hücre hatlarında sırasıyla 13,75 nM ve 11,22 nM olarak bulundu. BZM'in IC50 dozu ile BRVD'nin 3.75, 7.5, 15 ve 30 µM dozları kombine edildiğinde, BZM + 3.75 µM BRVD kombinasyonunun her iki hücre hatında additif etkiye (CI=1), diğer tüm BRVD konsantrasyonlarının ise BZM'le birlikte doza bağlı olarak artan sinerjistik etkiye neden olduğu bulundu (CI<1). Ayrıca, BRVD'nin her iki hücre hatında HSP27 gen ifade düzeyinde kontrole göre anlamlı bir düşüşe neden olduğu saptandı (p<0.05). İlginç olarak BZM'in de her iki hücre hattında HSP27 gen ifade düzeyinde kontrole göre anlamlı bir azalmaya neden olduğunu bulundu (p<0.05). Sonuç olarak biz BRVD-BZM kombinasyonunun MM tedavisinde kullanılabileceğini ve tedavinin etkililiğinde HSP27 gen ifade düzeyinin baskılanmasının rol alabileceğini önerdik.

Anahtar Kelimeler: HSP27, Brivudin, Bortezomib, Multiple myeloma

Temmuz, 2022; 67 sayfa

MASTER'S THESIS

INVESTIGATION OF THE USABILITY OF HSP27 INHIBITOR'S BRIVUDIN COMBINED WITH BORTEZOMIB IN MULTIPLE MYELOMA TREATMENT

Ayşegül TETİK

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

Advisor: Prof. Dr. Kamile ÖZTÜRK

ABSTRACT

Multiple myeloma (MM) is a hematological cancer characterized by the accumulation of malignant plasma cells responsible for the production of nonfunctional monoclonal immunoglobulin in the bone marrow. HSP27, a small member of the heat shock protein family, has shown to play a role in both the pathogenesis of MM and the development of resistance to therapy. Although great progress has been made in the myeloma treatment especially with proteasome inhibitors such as bortezomib, MM cannot be fully cured in clinical practice. The aim of this study is to investigate the usability of biruvidin, an antiviral drug, in the treatment of myeloma combined with bortezomib.

For this purpose, we detected the cytotoxicity of brivudine (BRVD) and bortezomib (BZM) alone or in combination in U266 and RPMI-8226 human myeloma cell lines using the MTT test. We calculated the IC₅₀ doses at 48 hours for both cell lines of BZM and BRVD. We determined the cytotoxicity in U266 and RPMI-8226 cell lines by keeping the BZM constant at the IC₅₀ dose and changing the BRVD concentration. We performed combination index (CI) analysis to evaluate the BZM-BRVD interaction. We also investigated the effect of BRVD and BZM application on HSP27 gene expression in U266 and RPMI-8226 cell lines using real time RT-PCR method. As a result, we found the IC₅₀ dose of BRVD at 48 hours to be 24.39 µM and 18.83 µM, respectively. We found the IC₅₀ value of BZM as 13.75 nM and 11.22 nM for 48 hours in U266 and RPMI-8226 cell lines, respectively. When the IC₅₀ dose of BZM and the 3.75, 7.5, 15 and 30 µM doses of BRVD are combined, the combination of BZM + 3.75 µM BRVD has an additive effect (CI=1) on both cell lines, while all other BRVD concentrations with BZM caused an dose-dependent increased synergistic effect (CI<1). In addition, we showed that BRVD caused a significant decrease in HSP27 gene expression level in both cell lines compared to the control (p<0.05). Interestingly, we found that BZM caused a significant decrease in HSP27 gene expression level in both cell lines compared to the control (p<0.05). As a result, we suggested that the combination of BRVD-BZM can be used in the treatment of MM and suppression of the HSP27 gene expression level may play a role in the effectiveness of the treatment.

Keywords: HSP27, Brivudine, Bortezomib, Multiple myeloma

July, 2022; 67 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Multiple myeloma gelişimi ve anormal plazma hücreleri.	5
Şekil 2.2. Bortezomibin yapısı.....	10
Şekil 2.3. ER stres uyaranları.....	11
Şekil 2.4. ER stresi ve ER stresine karşı hücrel cevaplar	12
Şekil 2.5. Proteazom kompleksi ve ubikütinasyon	14
Şekil 2.6. HSP70'nin hücrel görevleri	18
Şekil 2.7. İnsan HSP27'nin yapısı ve aktivasyonu	21
Şekil 2.8. HSP27'nin apoptosisteki rolü	24
Şekil 2.9. HSP27 inhibitörleri.....	25
Şekil 2.10 Brivudinin yapısı	25
Şekil 3.1 Sarı renkli tetrazolyum boyası MTT'nin formazana indirgenmesi	25
Şekil 3.2 SYBR Green'in bağlanma reaksiyonu	35
Şekil 4.1. U266 hücrelerinin 25X büyütülmüş görüntüsü	38
Şekil 4.2. RPMI-8226 hücrelerinin 25X büyütülmüş görüntüsü	38
Şekil 4.3. MTT testte oluşan formazan kristallerinin görüntüsü.	39
Şekil 4.4. Brivudin ile muamele edilen U266 hücrelerinde MTT test plağının görüntüsü.	39
Şekil 4.5. Bortezomib ile muamele edilen U266 hücrelerinde MTT test plağının görüntüsü.	40
Şekil 4.6. Bortezomib uygulamasının U266 hücre hattındaki % canlılığa etkisi.	41
Şekil 4.7. Bortezomib konsantrasyonlarının logaritmasına karşılık U266 hücrelerinin % canlılığı.	41
Şekil 4.8. Bortezomib uygulamasının RPMI hücre hattındaki % canlılığa etkisi.	42
Şekil 4.9. Bortezomib konsantrasyonlarının logaritmasına karşılık RPMI-8226 hücrelerinin % canlılığı.	42
Şekil 4.10. Brivudin uygulamasının U266 hücre hattındaki % canlılığa etkisi.	44
Şekil 4.11. Brivudin konsantrasyonlarının logaritmasına karşılık U266 hücrelerinin % canlılığı	44
Şekil 4.12. Brivudin uygulamasının RPMI-8226 hücre hattındaki % canlılığa etkisi.	45
Şekil 4.13. Brivudin konsantrasyonlarının logaritmasına karşılık RPMI-8226 hücrelerinin % canlılığı.	46
Şekil 4.14. U-266 hücresi BZM ve BRVD kombine ilaç uygulanması grafiği.	48
Şekil 4.15. RPMI-8226 hücresi BZM ve BRVD kombine ilaç uygulanması grafiği.	48
Şekil 4.16. İzole edilen RNA'ların agaroz jel görüntüsü	50
Şekil 4.17. Bortezomib ve Brivudin uygulamasının U226 hücre hattında HSP27 mRNA düzeyine etkisi	53
Şekil 4.18. Bortezomib ve Brivudin uygulamasının RPMI-8226 hücre hatında HSP27 mRNA düzeyine etkisi	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Myeloma gelişiminde tanı kriterleri	7
Çizelge 2.2. Myelomanın evrelerine göre tanı kriterleri	8
Çizelge 4.1. 48 saatlik bortezomib uygulamasının U266 hücre hattındaki % canlılık değerlerinin ortalaması ve standart sapmaları.....	41
Çizelge 4.2. 48 saatlik bortezomib uygulamasının RPMI-8226 hücre hattındaki % canlılık ortalamaları ve standart sapma değerleri.	42
Çizelge 4.3. 48 saatlik brivudin uygulamasının U266 hücre hattındaki % canlılık ortalamaları ve standart sapma değerleri.....	43
Çizelge 4.4. 48 saatlik brivudin uygulamasının RPMI-8226 hücre hattındaki % canlılık ortalamaları ve standart sapma değerleri.....	45
Çizelge 4.5. İnsan U-266 hücre hatlarının bortezomib+brivudinin farklı dozlarının kombine olarak uygulanması ve inhibisyon değerleri.....	47
Çizelge 4.6. İnsan RPMI-8226 hücre hatlarının bortezomib+brivudinin farklı dozlarının kombine olarak uygulanması ve inhibisyon değerleri.	47
Çizelge 4.7. U266 hücrelerinden izole edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı.....	49
Çizelge 4.8. RPMI-8226 hücrelerinden izole edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı.	50
Çizelge 4.9. U266 hücrelerinden sentezlenen cDNA'ların konsantrasyonu ve saflığı.....	51
Çizelge 4.10. RPMI-8226 hücrelerinden sentezlenen cDNA'ların konsantrasyonu ve saflığı.	51

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACD	α -kristalin domaini
AKT	Protein kinaz B (PKB)
ASCT	Otolog kök hücre transplantasyonu
ATF6	Aktive edici transkripsiyon faktör 6
Bax	BCL-2 ile ilişkili X proteini
Bcl-2	B hücresi lenfoma 2
Bid	Pro-apoptotik protein
BİP	Transmembran proteini
BRVD	Brivudine, RP101, Bromovinyldoxyuridine
BZM	Bortezomib
cDNA	Komplementer DNA
CTE	C-terminal uzantısı
CMA	Şaperon aracılı(seçici) otofaji
DAXX	Ölüm alanı ile ilişkili protein
DMSO	Dimetil sülfoksit
DRd	Daratumumab, lenalidomid ve deksametazon
EDTA	Etilen diamin asetik asit
ER	Endoplazmik retikulum
ERAD	ER ile ilişkili bozunma
FBS	Fetal bovine serum
HSE	Isı şoku elementi
HSF	Isı şok faktörü
HSP	Isı şok proteinleri
Ig	İmmünoglobulinler
IMiD	İmmünomodülatör ilaçlar
IRE1	İnositol gerektiren enzim-1
JNK	c-Jun N-terminal kinazlar
MAPK	P38 mitojenle aktive olan protein kinaz
MM	Multiple myeloma
MGUS	Önemi belirsiz monoklonal gamopati
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolyum bromür
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
PERK	Çift sarmallı RNA ile aktive olan protein kinaz [PKR] benzeri ER kinaz
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinazlar
PKC	Protein kinaz C
P53	Tümör baskılayıcı protein
P21	Siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü
P38	Mitojenle aktive olan protein kinaz
PBS	Fosfat tamponu
PI	Proteazom inhibitörleri
ROS	Reaktif oksijen bileşikleri
RQ	Relative kantitasyon
SMM	Sessiz myeloma
sHSP	Küçük ısı şoku proteinleri
TNF	Tümör nekrosiz faktör
TNF-1	TNF reseptörü ile ilişkili protein 1
UPS	Ubikutin proteasome sistemi
UPR	Katlanmamış protein cevabı

VAD	Vincristine, doxorubicin ve dexamethasone
VRd	Bortezomib, lenalidomid, deksametazon
XBP1	Transkripsiyon faktörü
α	Alfa
β	Beta
μ	Mikro
L	Litre
Mg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
mg	Miligram
μM	Mikromolar
nM	Nanomolar
$^{\circ}$C	Santigrat derece



1. GİRİŞ

Multiple myeloma (MM) fonksiyonel olmayan monoklonal immunoglobulin üretiminden sorumlu malign plazma hücrelerinin kemik iliğinde birikmesiyle karakterize edilen hematolojik bir kanserdir. Hematolojik kanserlerin %13'ünü temsil eden MM, fonksiyonel olmayan immünoglobulinleri (Ig) üreten ve salgılayan bir plazma klonundan kaynaklanır. Şu andaki mevcut tedaviler sadece geçici cevaplar oluşturduğu için MM pratikte tedavi edilemez. MM'nın en önemli özelliği M protein ya da paraprotein denilen anormal monoklonal immunoglobulinin hücre içerisinde aşırı birikmesidir. MM gelişimi genetik mutasyonlar, kromozom anomalileri, kopya sayısı anormalikleri ve gen ifade düzeylerindeki değişikliklerden kaynaklanır. Bu genetik değişikliklerin tamamı plazma hücrelerinin anormal çoğalmasına ve hatalı Ig'lerin (M protein) hücre içerisinde aşırı birikmesine ve hücre dışına salınmasına neden olur [1,2]. Günümüzde bortezomib ve carfilzomib gibi proteasome inhibitörleri MM tedavisinde büyük bir ilerlemeye neden olmuştur. Bortezomib, bir dipeptit boronik asit türevi olup, proteozomun kimotripsin benzeri aktivitesini geri dönüşümlü olarak inhibe eder. Başlangıçta hastaların büyük bir çoğunluğu bortezomibe cevap vermekte ve hastalık gerilemektedir, ancak yaklaşık bir yıl sonra hastalık tekrar nüks etmekte ve bortezomibe karşı direnç gelişmektedir. Şu anki mevcut kemoterapötik tedavilerle hastaların ortalama sağ kalımı yaklaşık 5 yıldır. Bu nedenle acil yeni tedavi stratejilerine ihtiyaç vardır [1-4].

Son yıllarda, Isı Şok Proteinleri (HSP) MM tedavisi için cazip bir terapötik hedef haline gelmiştir. Çünkü HSP'leri, malign plazma hücrelerinde aşırı derecede üretilen ve hücre içerisinde biriken monoklonal proteinin neden olduğu proteotoksik stresle mücadelede kritik öneme sahiptir [3,4]. HSP'leri hücrel protein homeostazı ve protein katlanmasında merkezi rol oynayan moleküler şaperonlardır. HSP'leri protein katlanması, yanlış katlanmış proteinlerin degradasyonu, proteinlerin hücre içi taşınımı, çeşitli sinyal yolları ve immün cevabın regülasyonu gibi birçok hücrel mekanizmada görev alan bir protein ailesidir.

Memeli hücrelerde, büyük molekül ağırlıklı (HSP 110, 90, 70, 60 ve 40) ve küçük molekül ağırlıklı (HSP27, HSPB1-10, vs) olmak üzere iki ana sınıfa ayrılırlar. HSP'ler sıklıkla hücrel stres cevabıyla ilişkili olmasına karşın, hücre büyümesi ve

farklılaşmasında da rol alırlar. Bu proteinlerin özellikle protein homeostazısını düzenlemesi, hücrelerin hayatta kalmasında hayati öneme sahiptir [5,6].

Son yıllarda, birçok farklı kanser türünde HSP'lerin normal hücrelere göre aşırı ifade olduğunun bulunmuş olması, araştırmacıları HSP'ler ve kanser gelişimi arasındaki ilişkiyi aydınlatmaya itmiştir. Bu bağlamda, HSP'lerin kanser hücrelerinin hayatta kalması, apoptosize direnmesi, invazyonu, metastası ve immün sistemden kaçışında görev aldığı gösterilmiştir [7,8,9]. Bu nedenle günümüzde HSP'ler kanser tedavisi için umut verici bir hedef haline gelmiştir. HSP'lerin potansiyel antikanser hedef olmasının ana nedenlerinden birisi hücre içerisinde aşırı birikmiş onkogenik ürünlerin neden olduğu proteotoksik strese rağmen kanser hücrelerinin hayatta kalmasını sağlamasıdır. Başka bir deyişle HSP'ler kanser hücrelerinin hayatta kalması ve proliferasyonuna neden olan onkogenik proteinlerin stabilizasyonunu ve mikroçevreye uygunluğunu sağlayarak kanseri tetiklemektedir [6-11].

Normal koşullarda hücrede sentezlenen proteinlerin doğru katlanması ve işlenmesi endoplazmik retikulumda (ER) gerçekleşir. Multiple myeloma hücrelerinde olduğu gibi hatalı sentezlenen veya yanlış katlanan proteinler ER lümeninde birikerek katlanmamış protein cevabını (UPR) tetiklerler. UPR hücrede moleküler şaperonların aktivitesini artırarak protein katlanmasına yardımcı olur veya protein sentezini inhibe edecek sinyal yollarını aktive eder. Eğer proteinler ER'da doğru bir şekilde katlanamazsa, ubiquitinlenerek sitoplazmaya gönderilir ve proteasomlarda yıkılır. Proteasomlara ek olarak otofaji mekanizması da hücrede aşırı biriken proteinlerin yıkımı için bir alternatif oluşturur [1,12-14].

Protein katlanmasından sorumlu moleküler şaperonlar olan HSP'leri protein homeostazında ve MM'da immunoglobulin katlanması ve işlenmesinde kritik rol oynarlar. MM hücrelerinin hayatta kalmasını sağlaması aynı zamanda kemoterapiye verilen cevabın da duyarsızlaşmasını sağlar [4,15]. Başka bir deyişle kemoterapiye karşı direnç gelişir.

Son yıllarda myeloma hücrelerinde aşırı üretildiği rapor edilen ısı şok protein ailesinin küçük üyesi olan HSP27 şaperonun hem MM patogenezinde hem de tedaviye direnç gelişmesinde rol oynadığı bildirilmiştir [6,16].

Tüm bu bilgiler ışığında, sunulan bu tez çalışmasında HSP27 inhibitörü olduğu birkaç çalışma ile gösterilmiş [17,18,19] olan brivudinin myeloma tedavisinde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Brivudin ((E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine) klinikte antiviral tedavi için kullanılan bir ilaçtır. Brivudinin antiviral etkinliği viral DNA sentezini bloke etmesine bağlıdır. Aynı zamanda HSP27 proteinine bağlanarak doğrudan HSP27'nin kendisini, dolaylı olarak da HSP27'nin hedef proteinlerinin inaktivasyonuna neden olduğu rapor edilmiştir [17,18,20-22].

Sunulan bu tez çalışmasında U266 ve RPMI-8226 insan multiple myeloma hücre hatları kullanılarak, brivudin ve bortezomibin tek başına ve kombine şekilde myeloma tedavisinde kullanılabilirliği in vitro olarak araştırılmıştır. Ayrıca, brivudin ve bortezomibin HSP27 gen ifade düzeyine etkisi real time RT-PCR yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlar, brivudinin bortezomib ile kombine tedavisinin multiple myeloma hücre hatlarının sitotoksitesi üzerine doza bağlı olarak artan güçlü sinerjistik etkiye neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca brivudinin U266 ve RPMI-8226 hücrelerinde beklenildiği gibi HSP27 gen ifadesini baskıladığı gözlenirken, bortezomibin de HSP27 ifadesini baskıladığı gözlenmiştir.

Bu sonuçlar brivudinin bortezomible birlikte myeloma tedavisinde kombine ilaç tedavisi olarak kullanılabileceğini ve tedavinin etkiliğinde HSP27 gen ifade düzeyinin baskılanmasının rol alabileceğini teklif eder.

2. KAYNAK ÖZETİ

2.1 Multiple Myeloma (MM)

Multiple miyeloma (MM), tek bir plazma hücresi klonunun anormal proliferasyonu ve kemik iliğinde birikmesi ile karakterize edilen tedavi edilemeyen hematolojik bir kanserdir. [23,24]. Myelom latince "miyel" (ilik) ve "oma" (tümör) kelimelerinden türetilmiştir. Malign plazma hücreleri hemen hemen her zaman birden fazla yerde meydana geldiğinden, genellikle multipl miyeloma olarak adlandırılır [1-26].

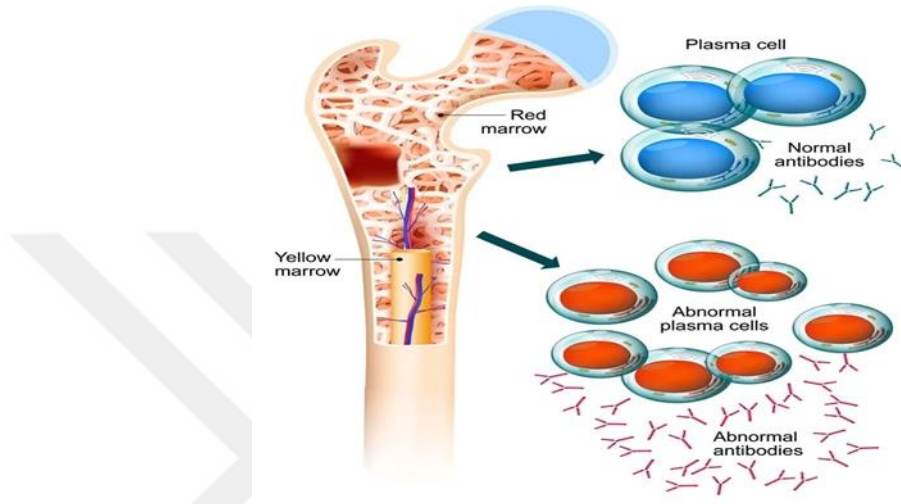
MM tüm kanserlerin %1'ini ve tüm hematolojik malignitelerin yaklaşık %10'unu oluşturur. Hematolojik maligniteler içinde Non Hodgkin Lenfomadan sonra ikinci en yaygın hematolojik kanserdir [23,26]. 2021 yılı itibariyle dünyada her yıl yaklaşık 86.000 yeni MM vakası ve buna bağlı 63.000 ölüm vakasının meydana geldiği rapor edilmiştir [27].

MM, bağışıklık sisteminin bir parçası olan ve antijene karşı antibadi üreten plazma hücrelerinin kemik iliğinde kontrolsüz çoğalmasıyla oluşur. MM hücrelerinin en belirgin özelliği, M protein ya da paraprotein olarak da adlandırılan fonksiyonel olmayan monoklonal immünoglobulin proteinini aşırı derecede üretmeleridir [23,28]. Myeloma hücrelerinin kemik iliğinde anormal derecede çoğalması ve bu hücrelerin ürettiği hatalı immünoglobulinlerin hücre içerisinde birikmesi ve salgılanması, MM hastalarında anemi, osteolitik kemik lezyonları, hiperkalsemi, böbrek yetmezliği ve tekrarlayan enfeksiyonlar gibi patolojik durumların ortaya çıkmasına neden olur [23,29,30].

MM bir ileri yaş hastalığıdır. Hastaların %85'i 65 yaşından büyük iken sadece %2'si 40 yaşın altındadır [26]. 65 yaş ve üstü bireylerde tanıdan sonraki ortalama 5 yıllık sağ kalım yaklaşık %46.6 dır [23]. MM tedavisinde ilk olarak proteazom inhibitörleriyle (PI'ler), sonrasında immünmodülatör ilaçlar (IMiD'ler) ve kemik iliği transplantasyonu gibi modern terapilerle hastaların 5 ve 10 yıllık sağkalım oranlarında artışlar elde edilmiştir. Ancak tedavi yöntemlerindeki tüm bu ilerlemelere karşın hastalığın tekrarlayan şekilde nüks etmesi ve uygulanan kemoterapik tedavilere direnç gelişmesinden dolayı [31], MM klinikte halen tam olarak tedavi edilemeyen bir kanser türüdür.

2.2 MM Sitogenetiği

MM bir plazma hücre kanseridir. Kemik iliğinde bulunan öncül B lenfositler (prokürsör, B lenfosit) antijenle karşılaştıktan sonra olgun plazma hücrelerine dönüşür. (Şekil 2.1) [32]. Normal plazma hücreleri antijene özgü antibadi üreten, terminal olarak farklılaşmış bölünmeyen hücrelerdir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Multiple myeloma gelişimi ve anormal plazma hücreleri [33].

Plazma hücreleri birçok mutasyon ve kromozomal anomali sonucu malign plazma hücresine dönüşür [32]. MM hücre genomu, hastalık patogenezi ve hastalığın klinik bulguları ile bağlantılı olan çok sayıda onkogen ve tümör baskılayıcı gen mutasyonları ve buna ek olarak birçok yapısal ve sayısal kromozomal anormallik ile karakterize edilir.

MM genomlarında hiperdiploidi ve trizomi vakalarına çok sık rastlanır (48-74 kromozom sayısı). Trizomi genellikle tek sayılı kromozomlarda (3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 ve 21.kromozom) oluşmaktadır [34].

MM hastalarının %90'ında kromozom anormallikleri görülmüştür [3]. Özellikle Ig gen lokuslarındaki translokasyonlar ve rekombinasyon hataları MM gelişimine özgüdür. IgH gen lokusundaki 14q32 translokasyonu MM vakalarının yaklaşık %50'inde görülür. Vakaların %60'nda hatalı Ig sentezine neden olan 11q13, 4p16.3, 16q23, 6p21 ve 20q11 rekombinasyon hataları mevcuttur. Bu genetik değişikliklerin tamamı hatalı Ig'lerin (M protein) hücre içerisinde aşırı birikmesine ve hücre dışına salınmasına neden olur [34]. MM'li hastaların %60'nda kromozom 1'in olduğu

bölgede kazanımlar, hastaların %59'unda kromozom 13 silinmesi (monozomi) saptanmıştır. Ayrıca tümör baskılayıcı gen olan p53 geninin olduğu kromozom 17'nin kısa kolunun kaybı hastalarda sıklıkla gözlenen bir mutasyondur [34,35].

Tanı aldıktan sonra takip edilen MM hastalarında, hastalığın klinik tablosu kötüleştikçe kromozom anomalilerinin ve mutasyon sıklığında arttığı saptanmıştır [36]. t(11;14)(q13;q32) translokasyonu taşıyan hastalar yüksek doz kemoterapi ve kök hücre tedavilerine cevap verebilen iyi prognozu gösterirken, t(4;14) translokasyonu tedaviden bağımsız kötü prognozla ilişkili bulunmuştur [35].

2.3 MM Gelişimi

MM hastalığı genellikle tanı konulmadan önce asemptomatik bir evre olan önemi belirsiz monoklonal gamopati (Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) denilen bir evreden gelişir [37]. MGUS evresi 50 yaş üstündeki nüfusun yaklaşık %3'ünde, 70 yaş üstündeki nüfusunda %5'inde görülür. Her yıl MGUS hastalarının %0,5 - 1'inin MM'ye ilerleme riski mevcuttur. Bu sebeple MGUS hastaları hastalık süresince takip edilir, fakat hastalık semptomları gözlenene kadar tedavi edilmez [38]. MGUS hastalarında kromozomal anomali ve mutasyon birikmesiyle hastalık sessiz miyeloma (Smoldering Multiple Myeloma-SMM) denilen bir evreye dönüşür. SMM evresinin tanıdan sonra MM'ye dönüşme riski ilk 5 yılda %10, sonraki 5 yılda %3 ve sonraki yıllarda %1,5'tir [39]. SMM vakalarında daha ileri mutasyon birikmesiyle hastalık artık klinikte tedavi gerektiren MM aşamasına geçer [38].

2.4 MM Tanısı

MM da tanı koymak için hastaların serum ya da idrarında veya ikisinde de monoklonal proteinin (M protein) saptanması, kemik iliğinde klonal plazma hücresi oranının belirlenmesi, anemi, kemik lezyonu - osteoporoz, böbrek yetersizliği ve hiperkalsemi gibi semptomların bir veya daha fazlasının tespit edilmesi gerekmektedir [37].

MM tanısı M Protein varlığını temel alır. Tanı için serum ve idrarda M proteinin ya da kemik iliğinde plazma hücre (hücresel sayının %10'dan fazla) varlığının saptanması gerekir. Ayrıca, yüksek serum kalsiyumu ($\geq 11,5$ g/dl), renal böbrek yetmezliği (serum

kreatinin ≥ 2 mg/dl) veya anemi (hemoglobin ≤ 10 g/dl veya normalin 2 g/dl altında) gibi kemik anormallikleriyle ilişkili organ hasarlarının saptanması gerekir [34].

Yeni tanı almış MM hastalarının MGUS ve SMM karıştırılmaması için tanı kriterleri Çizelge 2.1’de sunulmuştur [34]. Ayrıca MM tanısı almış hastalarda hastalığın ilerleyişine göre yapılan bugün klinikte kullanımı önerilen Durie-Salmon evrelendirme sistemi ve buna ait klinik veriler Çizelge 2.2’de sunulmuştur.

Çizelge 2.1. Myeloma gelişiminde tanı kriterleri [34].

Hastalık	Kriterleri
MGUS	Serum monoklonal protein seviyesi < 3 g/dl ve klonal kemik iliği plazma hücreleri $< \%10$ Plazma hücre diskrazisine bağlı semptomların ve uç organ hasarının olmaması (litik kemik lezyonları, anemi, hiperkalsemi veya böbrek yetmezliği)
SMM	Serum monoklonal protein seviyesi ≥ 3 g/dl ve/veya klonal kemik iliği plazma hücreleri $\geq \%10$ Plazma hücre diskrazisine bağlı semptomların ve son organ hasarının olmaması (litik kemik lezyonları, anemi, hiperkalsemi veya böbrek yetmezliği)
MM	Serum ve/veya idrar monoklonal proteini ve/veya klonal kemik iliği plazma hücreleri Plazma hücresi diskrazi ile ilişkili litik kemik lezyonları, anemi, hiperkalsemi veya böbrek yetmezliği varlığı

Çizelge 2.2. Myelomanın evrelerine göre tanı kriterleri [34].

MM EVRESİ	Durie-Salmon evrelendirme sistemi	Uluslararası Evrelendirme Sistemi
I	Hemoglobin >10 g/dl, Albümin >3,5 g/dl Serum kalsiyumu ≤12 mg/dl Miyelomla ilişkili kemik lezyonu yok Düşük M-protein konsantrasyonu (IgG <5 g/dl, IgA <3 g/dl) Bence Jones protein <4 g/24 saat)	β2-mikroglobulin <3,5 mg/L Hemoglobin >10 g/dl Albümin >3,5 g/dl
II	Ne evre I ne de evre III	Ne evre I ne de evre III
III	Hemoglobin <8.5 g/dl, Serum kalsiyumu >12 mg/dl Geniş litik kemik lezyonları Yüksek M-protein konsantrasyonu (IgG >7 g/dl, IgA >5 g/dl veya Bence Jones protein >12 g/24 saat)	β2-mikroglobulin >5.5 mg/L

2.5 MM'nın Tedavisi

MM yeni tanısı almış hatalarda tedavi kişiye göre planmaktadır. Genel olarak tedavi planı hastalığın yayılma durumu ve ilerleme hızı, kişide başka herhangi bir koroner hastalık olup olmadığı ve hastanın yaşı göz önüne alınarak planlanır. Yeni tanı alan hastalarda proteasome inhibitörleri, immunomodülatör ilaçlar ve hücre yüzey moleküllerini hedef alan antikorların kullanımı ve ayrıca genç hastalarda yüksek doz kemoterapi sonrası otolog kök hücre transplantasyonu (ASCT) gibi tedavi seçenekleri mevcuttur. ASCT için uygun olan hastalarda ortalama sağ kalım 10 yıla kadar çıkarken, transplantasyon için uygun olmayan hastalarda bu oran ortalama 4-5 yıl kadardır [40].

MM tedavisinde kullanılan ilaçlar, alkileyici ajanları (melphalan, siklofosfamid) kortikosteroidleri (deksametazon, prednizon), immünomodülatör ilaçları (talidomid, lenalidomid, pomalidomid) ve proteazom inhibitörlerini (bortezomib, karfilzomib, ixazomib) içerir. Daratumumab ve isatuksimab, CD38'i hedefleyen monoklonal (M) antikorlardır ve MM tedavisinde giderek daha önemli bir rol oynamaktadır. ASCT

adayı hastaları için tercih edilen başlangıç tedavisi bortezomib, lenalidomid, deksametazondur VRd dir. Transplantasyon için uygun olmayan hastalarda başlangıç tedavisi için iki ana seçenek uygulanmaktadır bunlar bortezomib, lenalidomid, deksametazon (VRd) ve daratumumab, lenalidomid, deksametazon (DRd) kombinasyonundan oluşur.

MM'li hastaların hemen hemen tümünde çok sayıda nüks gelişir. Aslında MM, çoklu remisyon ve relapslarla karakterize bir hastalıktır. Modern terapi ile, MM'nin ilk nüksü, ilk tanıyı takip eden ~3–4 yıl sonra ortaya çıkar [39]. Sonraki her remisyon giderek daha kısa sürelidir ve sonuçta hastalar hastalığın kendisinden veya tedaviye bağlı komplikasyonlarda sonucu kaybedilir [40].

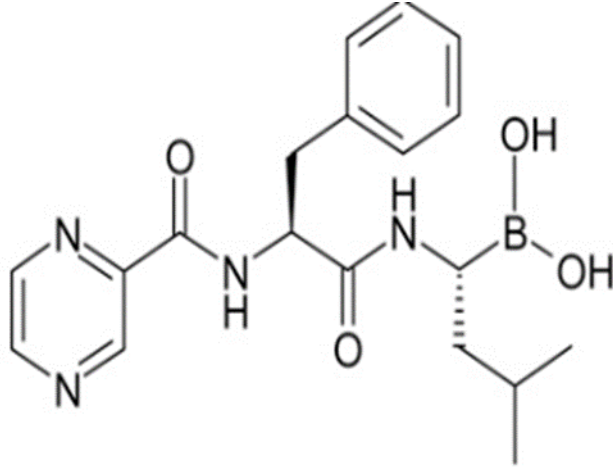
2.6 MM' da Yeni Tedavi Seçeneklerinin Araştırılması

MM'nın en belirgin özelliği fonksiyonel olmayan ve hücre içerisinde aşırı derecede biriken M proteinin neden olduğu proteotoksik strestir. Hücrelerin hayatta kalması için bu stresle başa çıkmalarında proteasome aktivitesi birincil öneme sahiptir. Bu nedenle proteasome inhibitörleri MM tedavisinde çığır açmışlardır. Bortezomib gibi proteazom inhibitörleri ile MM tedavisinde büyük gelişmeler elde edilmesine rağmen MM halen klinikte tedavi edilemeyen bir hastalıktır. Çünkü MM tedavisindeki en önemli sorunlardan birisi tedaviye karşı direnç gelişmesi ve hastalığın tekrar nüks etmesidir. Bu nedenle MM tedavisi için acil yeni tedavi stratejilerine ihtiyaç vardır. Şu anki mevcut tedavilerle hastaların ortalama sağ kalımı yaklaşık 5-10 yıldır [3,4,41].

2.6.1 Bortezomib

Bortezomib, yapısında boronik asit ile pirazinoik asit, fenilalanin ve lösin içeren bir dipeptit boronik asit türevidir (Şekil 2.2). İlk olarak bortezomib, 1995 yılında Myogenics Company tarafından sentezlenmiştir ve MG-341 olarak adlandırılmıştır. In vitro ve in vivo umut verici sonuçların ardından çalışmalarda, multipl miyelom kanserli hastalarda küçük bir Faz I klinik denemesinde test edilmiş ve daha sonra PS-341 olarak adlandırılmıştır. 1999 yılında Millennium Pharmaceuticals, adlı şirket bu potansiyel antikanser ilacını önceki şirketten alarak kapsamlı klinik deneyler gerçekleştirmiştir. 2003 yılında, ilk sentezden yedi yıl sonra, nihayet ABD'de FDA tarafından, multipl miyelom hastalarının tedavisi için bortezomib (marka adı Velcade®) adıyla onaylanmıştır. Bortezomibin moleküler formülü C₁₉H₂₅BN₄O₄ ve

kimyasal IUPAC adı [3-metil-1-(3-fenil-2-pirazin-2-ilkarbonilamino-propanoil) amino- bütıl] boronik asittir [42]. 2008 yılından itibaren MM tedavisinde aktif olarak kullanılmaktadır [42-44].



Şekil 2.2. Bortezomibin yapısı [44].

Bortezomib, 26S proteazomunun geri dönüşümlü inhibitörü olarak çalışır [42]. Yeni tanı ve nüksetme relaps durumundaki birçok multiple myeloma hücreleri proteazom inhibitörlerine duyarlıdır [24]. Proteazom inhibitörleri diğer kanserlere oranla en çok MM da kullanılır ve etkinliği en fazla MM dadır. MM'nın en belirgin özelliği fonksiyonel olmayan M proteinin hücre içerisinde aşırı birikmesidir. Hücre içerisinde aşırı derece biriken M proteinine rağmen hücrenin hayatta kalmasında proteasome aktivitesi birincil öneme sahiptir. Bu nedenle proteasome inhibitörleri MM tedavisinde çığır açmışlardır [3, 4].

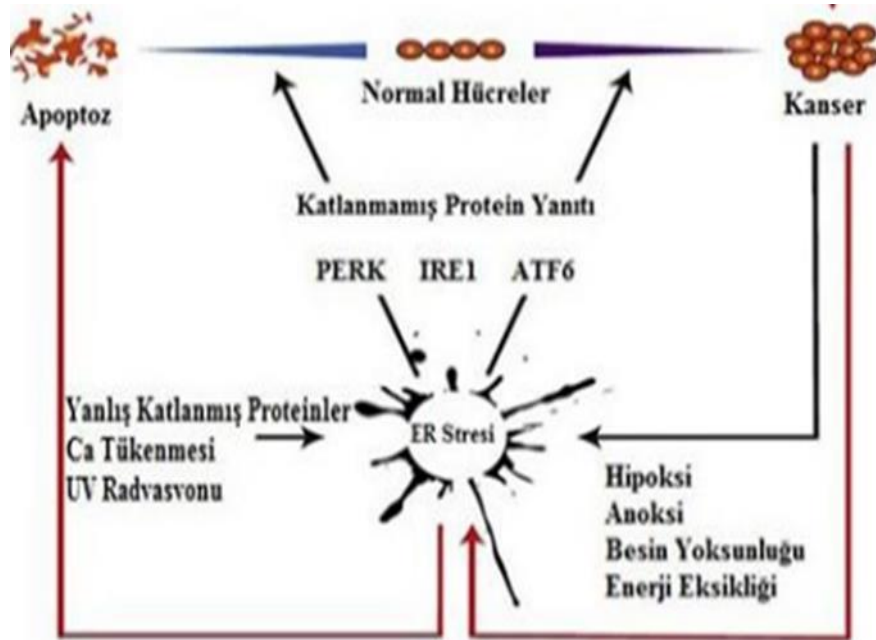
MM hücrelerinin bu aşırı biriken M proteinine rağmen hayatta kalması, büyük bir oranda proteasome aktivitesine (ubikutin proteasome sistemi; UPS) bağlıdır. Bu nedenle, MM tedavisinde hücrede aşırı birikmiş M proteinin yıkımını sağlayan proteasome inhibitörleri etkin bir tedavi stratejisi sağlamaktadır [35,45-47].

2.7 MM ve ER Stres

MM hücrelerinin en belirgin özelliği fonksiyonel olmayan hatalı M proteinin aşırı derece ifade etmesi ve bu proteinin hücre içerisinde aşırı derecede birikmesidir. Bu durum MM hücrelerinde protein homeostazının bozulmasına neden olarak proteotoksik strese (Endoplazmik retikulum, ER stres) neden olur.

Protein homeostazı, protein sentezi, katlanması ve bozunması arasındaki dengenin sağlanmasıdır [46-48]. Hücrede oluşan her türlü stres hücreyi bütünüyle etkilediğinden dolayı proteotoksik stres meydana gelmektedir. Hücre içerisinde katlanmamış ve/veya yanlış katlanmış proteinlerin birikimi, düzensiz gen transkripsiyonu, mutasyona uğramış genler tarafından kodlanan hatalı proteinler, oksidatif stres, kemoterapi ve radyasyonun neden olduğu hasarlı proteinlerin varlığı hücrede proteotoksik strese neden olur. Hücrede katlanmamış ve/veya yanlış katlanmış protein birikimi olduğunda ER Stresi oluşur. ER stresi yanlış katlanmış proteinlerin yanı sıra hipoksi, ROS, kemoterapi, onkogenlerin birikmesi ve besin yetersizliği gibi birçok farklı stres koşulunda da indüklenebilir (Şekil 2.3).

Hücreler ER stresıyla başa çıkmak için protein sentezini azaltarak geçici bir adaptasyon sağlar, bu durum ER'ye giren protein yükünde bir azalmaya yardımcı olur. Ancak hücrenin ER stresine karşı protein homeostazını sağlayarak hücrelerin hayatta kalmasını sağladığı birkaç ana mekanizma vardır. ER stresine karşı hücre katlanmamış protein yanıtı (UPR), ER ile ilişkili bozunma (ERAD), otofaji, proteosomal aktiviteyi artırma, ER genişlemesi, protein sentezini azaltma ve şaperon (ısı şok proteinleri) aktivitesi artırmak gibi çoklu mekanizmalarla cevap oluşturur [48,49]. Ancak homeostazın sağlanamadığı ve stresin giderilmediği durumlarda hücre bu duruma yenik düşer ve apoptoza girmektedir [50].

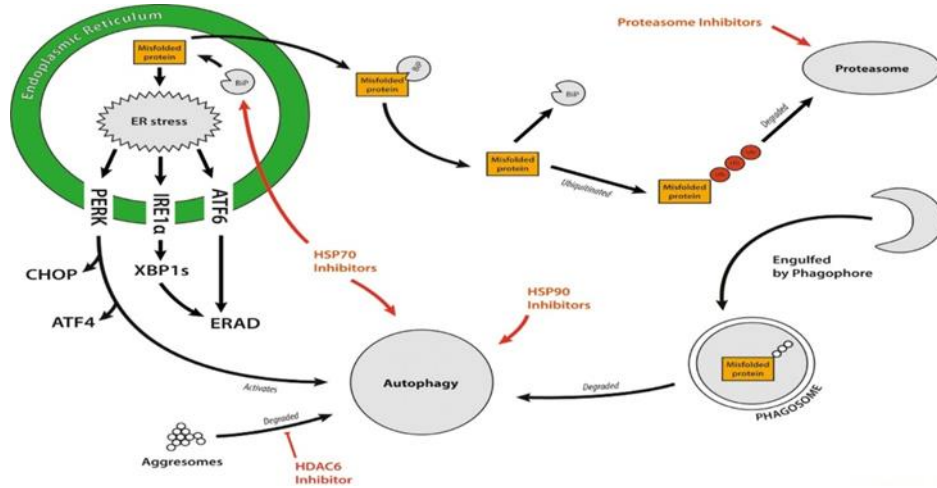


Şekil 2.3. ER stres uyaranları [51].

2.8 ER Stresine Karşı Katlanmamış Protein Cevabı (UPR)

Yanlış katlanmış proteinlerin hücrede birikmesi ER stresinin indüklenmesine neden olur, bu da katlanmamış protein cevabını (UPR) aktive eder. ER stresine karşı hücresel cevabın başlaması için IRE1, PERK ve ATF6'dan oluşan üç farklı ER transmembran proteini gereklidir (Şekil 2.4). Bunlar IRE-1 (inositol gerektiren enzim-1), PERK (çift sarmallı RNA ile aktive olan protein kinaz [PKR] benzeri ER kinaz) ve ATF6 (aktive edici transkripsiyon faktörü 6) dır. Bu üç proteinin aktive olması ve UPR cevabının indüklemesi için bir şaperon olan BİP (GRP78) proteini gereklidir. BİP yanlış katlanmış ubiküitlenmiş proteinlere bağlanarak onları sitoplazmadan ER lümenine taşır, böylece IRE1, PERK ve ATF6'nın aktivasyonu sağlanarak UPR cevabı oluşur (Şekil 2.4).

Stres yokluğunda BİP proteini ER membranındaki IRE1, PERK ve ATF6'ya bağlı bir şekilde bulunur. Böylece bu üç proteinin aktivasyonu engellenir. Stres koşullarında; yani katlanmamış veya hatalı katlanmış proteinlerin birikimi durumunda BiP yanlış katlanmış proteine bağlanmak için IRE1, PERK ve ATF6'dan ayrılarak bu proteinlerin spontan olarak oligomerize/ dimerize olmasına ve kendi kendilerini fosforlayarak sonrasında aktivasyonlarına yol açmaktadır [50-53].



Şekil 2.4. ER stresi ve ER stresine karşı hücresel cevaplar [50].

ATF6 bir tip II transmembran proteinidir [54]. ER stresini hafifletmek için protein katlanmasında görev alan şaperonların transkripsiyonunu başlatır [55,56].

PERK, ER stresi için en hızlı sensör olan sitozolik serin/treonin kinaz alanına sahip bir tip I transmembran proteinidir. PERK ve ATF6, UPR'da salgı proteinlerinin transkripsiyonunu azaltarak katlanmamış proteinlerin birikimini azaltmaya çalışır ve ER ile ilişkili bozunma (ERAD) veya lizozomal bozunma yoluyla yanlış katlanmış veya yavaş katlanan proteinlerin çıkarılmasını artırır.

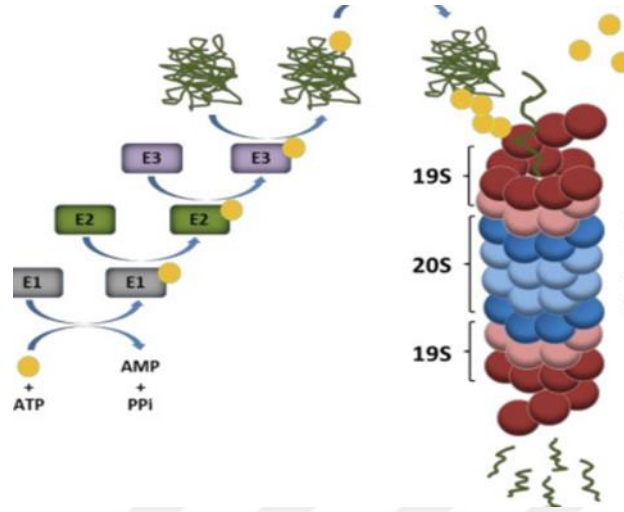
IRE1 α , bir protein serin/treonin kinaz ve endoribonükleaz alanına sahip bir tip I transmembran proteinidir. IRE1, XBP1 transkripsiyonel faktörünü indükleyerek ya mRNA bozulmasını sağlayarak protein sentezinin azaltır ya da şaperon proteinlerinin transkripsiyonu indükleyerek katlanmaya yardımcı olur [55-57].

2.8.1 ER stresine karşı ubikutin proteazom sistemi (UPS)

Yanlış katlanmış ya da hatalı proteinlerin neden olduğu ER stresi hücrede bu proteinlerin yıkımını sağlayan proteasome yolağını aktive eder. Proteasomlar katlanmamış, yanlış katlanmış, hasar görmüş veya hücre döngüsü, apoptosis ve transkripsiyon faktörler gibi kısa ömürlü sinyal proteinlerinin ubikutinlenerek yıkımından sorumlu proteaz kompleksleridir. Proteazom, 20S çekirdek kompleksi ve 19S düzenleyici kompleksi içeren bir 26S enzim kompleksidir. 20S birimi α - ve β -alt birimlerinden oluşan dört heptamerik halkadan oluşan fıçı benzeri bir yapı sergiler. İki dış halka, N-terminalleri iki iç halkayı oluşturan yedi β -altbirime yönelik olan yedi α -alt birimden oluşur. 20S kompleksinin katalitik aktivitesi, sırasıyla kaspaz, tripsin ve kimotripsin benzeri aktiviteler sergileyen treonin proteazlar olan β 1, β 2 ve β 5 alt birimlerinin dahil edilmesiyle sağlanır [58].

Proteasomda yıkılacak olan proteini öncelikle ubikutin ile işaretlenmesi gerekir. Ubikitinasyon 2 şekilde gerçekleşir. Birincisi hedef proteinlerin lizin kalıntıları ile ubikuitinin C-terminalindeki glisin (glisin 76) arasında izopeptid bağlarının oluşumu ile ikincisi ise sırasıyla ester veya tiyoester bağları yoluyla substratların serin/treonin veya sistein kalıntılarında meydana gelmektedir. Ubikitinasyon işlemi, ubikuitin moleküllerini hücresel hedeflere sıralı bir şekilde aktaran bir enzim (E1, E2 ve E3) kaskadıdır. Ubikuitin-aktive edici enzim (E1) ilk önce bir ATP-hidrolize ile ubikuitini aktive eder ve daha sonra ubikuitin-konjuge edici enzimin (E2) aktif bölgesindeki sistein rezidüsüne transfer edilir. Daha sonra, iki aşamalı bir reaksiyonla, E2 enzimleri, spesifik hedefleri tanıyan ubikuitin-ligazların (E3) yardımıyla substratlara ubikuitin

konjugasyonu sağlar. Bu süreçte, substrat özgüllüğü, insan genomu tarafından kodlanan tahminen 500-1000 tane varsayılan E3 ligaz tarafından sağlanır (Şekil 2.5) .



Şekil 2.5. Proteazom kompleksi ve ubikütinasyon [58].

2.8.2 ER stresi ve ısı şok proteinleri (HSP)

Isı şok proteinleri (HSP) ER stresine karşı cevapta indüklenen bir protein ailesidir. HSP'ler yanlış katlanmış peptitlerin yeniden katlanmasında, geri dönüşü olmayan proteinlerin bozunmasında, strese karşı kararsız polipeptit kümelenmelerinin önlenmesinde, hücre içi trafikte, bazı sinyal yollarının modüle edilmesinde ve bağışıklık tepkilerini düzenlemek gibi birçok hayati hücresel süreçte rol alan bir protein ailesidir [5, 8,59,60].

ER stresine neden olan koşullar hücrede HSP proteinlerinin transkripsiyonunu sağlayan ısı şok faktörlerinin (HSF) aktivasyonunu sağlar.

2.9 Isı Şok Proteinleri (HSP)

2.9.1 Isı Şok Faktörleri

Proteotoksik strese ve ER stresine neden olan faktörler, Isı Şok Faktörleri (HSF)'nin aktivasyonuna yol açar. HSF'ler, Isı Şok Proteinleri (HSP)'nin transkripsiyonu indükleyen transkripsiyonel faktörlerdir. ER stresi HSF'lerin sitoplazmadan çekirdeğe transferini sağlar. Bu durum, HSF'lerin stressle indüklenen hedef genlerinin (HSP'ler) promotor bölgesindeki ısı şoku elementlerine (HSE) hızla bağlanmasını ve mRNA transkripsiyonunun indüklenmesi sağlar. Böylece sitozolik HSP düzeyi artmış olur.

HSP'ler yanlış katlanmış ya da katlanamamış proteinlerin doğru katlanmasını sağlayan şaperon molekülleridir [61].

İnsanda 6 tane HSF geni mevcuttur. Bunlar; HSF1–2, HSF4–5, HSFX-Y dir. HSF1, bu izoformların en çok anlaşılanıdır. HSF2 erken gelişimle bağlantılıdır, HSF4 göz merceği gelişiminde rol oynar, HSF5 ve HSFX'in işlevi şu anda bilinmemektedir. HSFY erkek fertilitesi ile ilişkilendirilmiştir [62].

HSF1 birkaç hastalıkta önemli rol oynadığı anlaşılan ilk tanımlanan transkripsiyon faktörüdür. HSF1 geni 8. kromozomun (8q24.3) uzun kolunda bulunup, 529 aminoasitlik bir proteine transle olur [62]. HSF1, HSP'lerin transkripsiyonundan sorumlu başlıca faktördür. Normal koşullar altında hücrede az olarak ifade edilen HSP genleri endojen ya da ekzojen kaynaklı stresten sonra protein katlanmasıyla başa çıkabilmek amacıyla indüklenirler. HSP genlerinin her biri, promotörleri içinde, strese maruz kalmayı neredeyse anında algılayan, monomerden trimer forma dönüşen ve güçlü bir şekilde HSP genlerini indükleyen bir protein olan, ısı şoku transkripsiyon faktörü 1 (HSF1) için bağlanma bölgeleri içerir.

Yapılan çalışmalarda HSF1'in özellikle meme, kolon, akciğer, endometriyal, prostat, hepatoselüler ve oral skuamöz hücreli kanser hücrelerinde aşırı derecede ifade edildiği ve kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir [63-65].

2.10 Isı Şok protein Ailesi (HSP)

HSP'ler ilk olarak *Drosophila* dokularında sıcaklığın ölümcül seviyeye kadar kademeli olarak arttırıldığında gözlenmiştir. Bu nedenle ısı şok proteinleri olarak adlandırılmıştır [65,66]. HSPler ısı şok proteinleri ökaryotlarda ve prokaryotlarda yüksek oranda korunmuş bir protein grubudur. Bu proteinlerin sentezi sadece yüksek ısı artışına toleransı artırmakla kalmayıp, aynı zamanda hipoksi, iskemi, endotoksinler gibi stres faktörleri, ağır metaller, organik çözücüler ve reaktif oksijen birleşikleri (ROS) gibi istenmeyen birçok durumda indüklenirler [65]. Böylece hücrelerin oldukça çeşitli olan stres koşullarına karşı korunması sağlar.

HSP'leri hücrel protein homeostazı ve protein katlanmasında merkezi rol oynayan moleküler şaperonlardır. HSP'leri protein katlanması, yanlış katlanmış proteinlerin degradasyonu, proteinlerin hücre içi taşınımı, çeşitli sinyal yolları ve immün

cevabın regülasyonu gibi birçok hücresel mekanizmada görev alan bir protein ailesidir. HSP'ler sıklıkla hücresel stres cevabıyla ilişkili olmasına karşın, hücre büyümesi ve farklılaşmasında da rol alırlar. Bu proteinlerin özellikle protein homeostazısını düzenlemesi, hücrelerin hayatta kalmasında hayati öneme sahiptir [5,6].

Hücreler stres tolerans sınırına ulaştığında, organizmaya geri dönüşü olmayan sistemik hasarı önlemek için ya programlanmış hücre ölümü apoptosis ya da otafijiye girerler. Ancak HSP'lerin varlığında, JNK, AKT ve NF-kB gibi çeşitli sinyal yollarının modülasyonu yoluyla proapoptojenik moleküllerin inhibe edildiği ve hücrenin stres koşullarına karşı direnebildiği gösterilmiştir [67].

HSP ler molekül ağırlıklarına göre iki grupta incelenmektedirler. Birincisi, molekül ağırlıkları 40 ila 110 kDa arasında değişen ATP'ye bağımlı yüksek moleküler ağırlıklı HSP'lerdir. Bunlar HSP110, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 ve HSP40 dır. İkincisi, molekül ağırlığı 8 ila 30 kDa arasında ATP'den bağımsız küçük moleküler ağırlıklı HSP'lerdir. Bunlar HSP27, HSP15 ve HSP10 gibi çok sayıda protein ailesinden oluşur [59,60].

2.10.1 Büyük molekül ağırlıklı HSP'ler

2.10.1.1 HSP110

HSP110 memelilerin sitoplazmasında bol miktarda bulunan bir şaperondur. HSP110'nun ER'da bulunan glukoz yokluğunda indüklenen homologu da Grp170 olarak adlandırılır. Hsp110'nun 105 α ve 105 β olmak üzere iki farklı formu vardır. Hsp105 α , hücrelerin sitoplazmasında ifade edilip ısı şoku ve diğer stres uyaranları tarafından indüklenebilir. Hsp105 β , özellikle çekirdekte lokalizedir ve sadece ısıyla indüklenebilir [68]. Hem Grp170 hem de Hsp110 proteinleri, Hsp70 ailesinin genel olarak bir bölümünü oluşturmaktadır. HSP110 denatüre proteinlerin agregasyonunda görev almaktadır. Ayrıca HSP70'e kıyasla agregasyonu daha yüksek verimlilikte önler. Bu nedenle HSP110'un protein katlanmasında doğrudan bir işlevi yoktur. HSP110 aromatik kalıntılara sahip substratları tercih ettiği için HSP70' den farklı substrat bağlanma özellikleri sergiler ve bu durum HSP110 ve HSP70'in farklı şaperon aktivitelerini açıklayabilir [6,68,69].

2.10.1.2 HSP90

HSP90 protein ailesi kendi içerisinde farklı alt gruplara ayrılır. Bunlar sitoplazmik Hsp90 α ve Hsp90 β , mitokondriyal TNF reseptörü ile ilişkili protein 1 (TRAP1) ve endoplazmik glukozla düzenlenmiş protein 94 (Grp94) tür.

Sitoplazmik izoform hücrenin hayatta kalması için elzemdir [68-70]. HSP90 sadece bir grup hedef protein ile etkileşime girmektedir. HSP90 protein katlanmasından ziyade hedef proteinin katlanmasına yardım eder ve proteinin katlanması için onu belirli bir pozisyonda tutarak diğer şaperon proteinlerine yardım eder. HSP90'nın hedef proteinleri esas olarak protein kinazlar, reseptörler ve transkripsiyon faktörlerinden oluşur ve bunların çoğu hücre döngüsünün kontrolü ve sinyal yollarında görev alır [71-73].

HSP90 yapısal olarak bir homodimerdir ve her biri esnek olarak birbirine bağlı 3 protomer bölgeden oluşmaktadır. Bunlar N terminal ATP bağlanma alanı (N-domain), orta alan (M-domain) ve bir C terminal dimerizasyon alanı (C domain)'ni içerir [74]. ATPaz aktivitesi HSP90 için esastır. ATP eklendikten sonra HSP90'da konformasyonel bir değişim gerçekleşir. HSP90 'V' şekilli formu açık konformasyonel durumu gösterirken, ATP bağlandıktan sonra N terminal alanında dimerize olarak kapalı konformasyon durumuna geçmektedir [6,74]. HSP90'nın 20'den fazla yardımcı şaperon proteini olduğu bilinmemektedir ve bunların hepsi substrat proteinin alımında, olgunlaşmasında, kontrolünde ve ATPaz aktivitesinin modülasyonda görev almaktadır [6].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, HSP90'nın pankreas, yumurtalık, meme, akciğer ve endometrial kanserler, orofaringeal skuamöz hücreli karsinom ve multipl miyeloma dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde yüksek düzeyde ifade edildiği rapor edilmiştir. HSP90'nın yüksek ekspresyonu, akciğer kanseri, özofagus kanseri, mesane kanseri, melanom ve lösemide kötü prognozun bir belirtisi olarak tanımlanmıştır [64]. Bu nedenle HSP90 inhibitörleri kanser terapisi için bir hedef tedavi oluşturular [72].

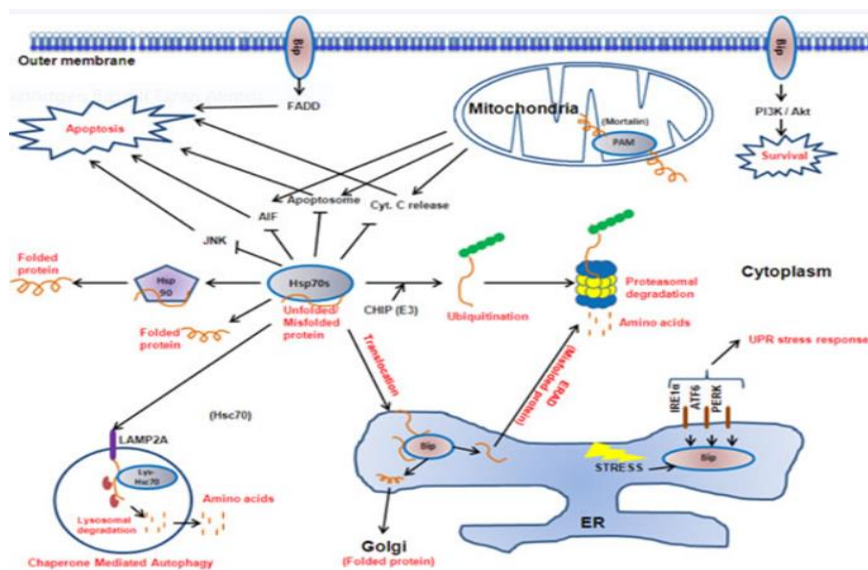
2.10.1.3 HSP70

HSP70 protein homeostazı için önemli bir şaperon olup protein katlanması ve yıkında rol alır. Prokaryotlar tek bir HSP70 proteini bulunmasına karşın, ökaryotlarda farklı hücre lokalizasyonlarında bulunan birkaç HSP70 proteini vardır. Sitoplazmada bulunan Hsc70, stres kaynaklı HSP72, endoplazmik retikulumda bulunan BİP (Grp78) ve mitokondride mortalin/Grp75' olarak bulunur [6,75,76].

Memeli hücrelerinde ubikuitin-proteazom sistemi (UPS), makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı(seçici) otofaji (CMA) olmak üzere 4 farklı protein yıkım yolu vardır. HSP70 bu yıkım yollarının tümüne substrat seçimi için özgüllük sağlar [75].

HSP70 yanlış katlanmış proteinlerin neden olduğu ER stresine cevapta merkezi rol alır. Yanlış katlanmış proteinleri lizozoma ve proteasome yıkım için gönderirken, doğru katlanmayı sağlamak için de HSP90'da yönlendirmektedir. Ayrıca bazı sinyal yollarını modüle ederek strese karşı hücrenin hayatta kalmasında kritik rol alır (Şekil 2.6). Özellikle sitoplazmik HSP70'in hem kaspaz bağımlı hem de kaspaz bağımsız apoptosis yollarını inhibe ettiği deneysel olarak gösterilmiştir [6].

HSP90 gibi HSP70 şaperonunun da prostat, karaciğer, meme, rahim ağzı, melanoma gibi birçok kanser türünde aşırı derecede ifade edildiği ve bunun kötü prognozla ilişkili olduğu rapor edilmiştir [64,73,76].



Şekil 2.6. HSP70'nin hücresel görevleri [6].

2.10.1.4 HSP60

HSP60 60 kDa ağırlığında bir şaperon proteinidir. HSP60 prokaryotlarda ve ökaryotlarda bol miktarda ifade edilir. Başlangıçta mitokondriyal homeostazı sağlayan bir protein olarak saptanmasına karşın, HSP60'ın sitoplazmada, plazma zarında ve hücre dışı boşlukta da bulunduğu gösterilmiştir [77].

Memelilerde HSP60'ın HSP10 ile bir kompleks yaptığı ve mitokondriyal proteinlerin katlanmasını kolaylaştırdığı, ayrıca sinyal iletimi, inflamasyon, bağışıklık yanıtı, hücre proliferasyonu, apoptosis ve protein trafiği gibi birçok biyolojik süreçte rol aldığı gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalar HSP60'ın kolon, karaciğer mide, pankreas, prostat, mesane, baş ve boyun kanserleri gibi birçok kanser türünde aşırı ifade edildiğini ve bu durumun kötü prognozla ilişkili olduğunu göstermiştir [64].

2.10.1.5 HSP40

HSP40'ın HSP içerisinde elliden fazla üyesi en büyük HSP ailesidir. HSP40 protein ailesi yüksek oranda korunmuş bir J-domenine (JDP'ler) sahiptir [78]. HSP40, yanlış katlanmış proteinleri ve protein agregatlarını tespit eden ilk moleküler şaperondur [78]. HSP40 protein ailesinin mide, kolorektal, servikal ve akciğer kanserlerinde aşırı derecede ifade edildiği rapor edilmiştir [64].

2.10.2 Küçük molekül ağırlığına sahip sHSPler

Küçük ısı şoku proteinleri (sHSP), HSP ailesi içinde oldukça yüksek çeşitliliğe sahip bir aileyi oluşturur. sHSP üyeleri birçok organizmada bulunmaktadır. Birçok farklı kaynaktan izole edilen çok sayıda sHSP üyesi bulunmuş olsa da aralarındaki homoloji çok düşüktür. Bu ailenin üyeleri birkaç tipik özellik ile karakterize edilir. Bunlar, düşük monomerik moleküler kütle (15-40kDa), α kristalin alanı olarak adlandırılan ~90 amino asit kalıntısından oluşan korunmuş bir bölgenin varlığı ve büyük oligomerik kompleksler oluşturmalarıdır [47]. Küçük HSP ailesi, HSPB genleri tarafından kodlanır ve HSP27 dahil 11 üyeden oluşur. Bunlar HSPB1 ila HSPB10, HSP27/HSPB1, MKBP (Miyotonik distrofi protein kinaz bağlayıcı protein) /HSPB2, HSPB3, α A-kristalin/HSPB4, α B-kristalin/HSPB5, HSP20/HSPB6, cvHSP

(kardiyovasküler ısı şoku proteini) /HSPB7, HSP22/HSPB8, HSPB9 ve ODF1 (dış yoğun fiber proteini) /HSPB10 şeklindedir [78].

sHSP protein ailesi iki sınıfa ayrılır Sınıf I (HSPB1, B5, B6 ve B8) çeşitli dokularda yaygın olarak dağılmıştır. Bununla birlikte, Sınıf II (HSPB2, 3, 4, 7, 9 ve 10) dokuya özgü ekspresyon sergilemektedir. sHSP'ler yüksek oranda korunmuş, 80-100 amino asitlik α -kristalin çekirdek alanına (ACD) sahiptir. Bu ACD domaini daha az korunmuş bir N-terminal domaini ve bir C-terminal uzantısı (CTE) ile çevrilidir.

sHSP'ler yüzeylerinde bulunan hidrofobik amino asit rezidüleri aracılığıyla, kısmen katlanmamış proteinlerle etkileşime girer ve protein agregasyonlarını önlerler. Moleküler şaperon olarak sHSP'ler, katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinleri tanıır ve onlara bağlanır. Böylece bu proteinlerin geri dönüşümsüz kümeleşmelerini önleyerek diğer şaperonlar tarafından yeniden katlanana kadar çözünür kalmalarını sağlar. sHSP'lerin aktivitesi için ATP hidrolizinin gerekmemesi ATP'nin normalin altında düşük olduğu stres koşullarında özellikle önemli hale gelir. sHSP genlerinin ekspresyonu ısı, oksidatif veya ozmotik stres, soğuk şok, ağır metaller gibi farklı stres koşullarında indüklenir. Ayrıca hücrenin onkojenik durumu ile ilgili ek sinyallerin de sHSP ifadesini artırdığı bilinmektedir [78-80].

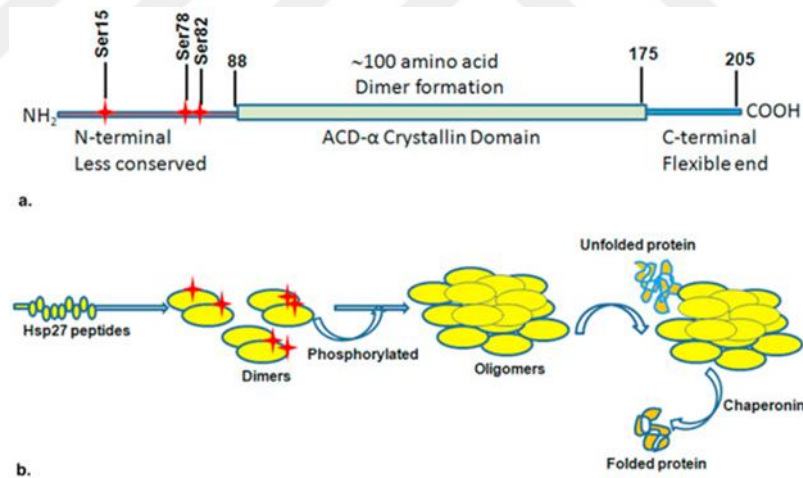
Bugüne kadar insanlarda 11 tane sHSP'i (HSPB1-HSPB11) tanımlanmıştır. Bu proteinlerden en çok çalışılan ve en iyi karakterize edileni HSPB1, diğer kullanım şekliyle HSP27'dir. HSP27 Oksidatif stres, antikanser ilaçlar ve radyasyon gibi stres koşullarında en güçlü indüklenen proteinlerden birisidir. HSP27 ısı, oksidatif stres ve diğer birçok farklı stres koşullarında hücrelerin hayatta kalmasını sağlar, ayrıca gelişim ve farklılaşma basamaklarında, hücre iskeletinin düzenlenmesinde ve kanser hücrelerinde apoptosizin inhibisyonu gibi birçok farklı biyolojik süreçte görev alır [46,78-81].

Son yıllarda yapılan çalışmalar tüm sHSP'lerin hücrel stres koşulları ve çeşitli hastalıklarda hücrel iyileşmeyi kolaylaştırmak için apoptotik sinyal yollarını koordineli bir şekilde düzenlediğini göstermiştir. Özellikle birçok kanser türünde yüksek sHSP seviyeleri gözlenmektedir [63,81].

2.10.2.1 HSP27'nin (HSPB1) yapı ve fonksiyonu

İnsan HSP27 (27 kDa) ağırlığında bir protein olup, 1980'lerin başında. HeLa hücrelerinin yüksek sıcaklığa maruz bırakılması sonrasında saptanmıştır [79]. HSP27 ATP den bağımsız çalışan bir şaperon proteindir. İnsan HSP27 proteini, kromozom 7q11.23'te bulunan insan HSPB1 geni tarafından kodlanır ve 205 amino asitten oluşur. HSP27 gen bölgesi transkripsiyonel faktör HSF1 ve HSF2'nin bağlanması için 2 bağlanma bölgesi içerir (HSE). Bunlardan bir tanesi ekson 1'in yaklaşık 200 bp yukarısında, ikincisi ise birinci intronun içinde yer alır [63].

HSP27 proteini yüksek oranda korunmuş bir α -kristalin domaini, daha az korunmuş WDPF dizisi içeren (W: triptofan, D: aspartik asit, P: prolin ve F: fenilalanin) bir N-terminal domaini ve 18-20 amino asitten oluşan bir C terminal domaininden oluşur (Şekil 2.7). N terminal domaininde kısmen korunmuş olan bir dizi (PSRLFDQXFGEXLL) mevcuttur. HSP27'nin multimer oluşturması ve şaperon aktivitesi için α kristalin yapısı ve WDPF sekansı gereklidir [63,82,83].



Şekil 2.7. İnsan HSP27'nin yapısı ve aktivasyonu [84].

Stres altında, HSP27 fosforile olur ve şaperon aktivitesi olmayan monomerler birleşerek (genellikle dimerler veya tetramerler) büyük oligomerik bir form oluşur. Bu form HSP27 oligomerinin şaperon aktivitesi kazanmasını sağlar. Şaperon aktivitesi için monomerlerin fosforilasyonu zorunludur. HSP27'nin fosforilasyonu, üç farklı serin (Ser) kalıntısında (Ser-15, Ser-78, Ser-82) ve bir Treonin (Thr) kalıntısında (Thr-

143) meydana gelir. Çok sayıda kinaz HSP27 fosforilasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Bunlardan P38 mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), protein kinaz C (PKC), aktive protein kinaz 2-3 (MK2, MK3) Ser-15'i fosforile edebilir. Ribozomal S6 kinaz (p70RSK), PKC, protein kinaz G ve MK2-MK3 Ser-78'i fosforile edebilirken Ser-82, MK2, MK3, p70RSK, protein kinaz B (PKB) ve protein kinaz D (PKD) tarafından fosforile edilebilir [85].

HSP27 stresin olmadığı koşullarda normal doku ve hücrelerde düşük seviyelerde ifade edilmektedir. Hücreyi strese sokan herhangi bir durumda ifade düzeyinde artış gözlenir. Kanser hücrelerinde HSP27'nin aşırı derecede ifade olduğu gösterilmiştir. Bunun nedeni olarak kanser hücrelerindeki hatalı onkogenik proteinlerin birikmesi, sinyal yollarının bozulması, HSP27 ve transkripsiyonel faktör (HSF) genlerinde mutasyonların olması gösterilmiştir [65]. Yapılan çalışmalarda HSF1 ifadesindeki artışın aynı zamanda HSP27 düzeyinde de artışa neden olduğu gösterilmiştir [82]. HSP27'nin özellikle kanser hücrelerinde yüksek düzeyde ifade edilmesi kanser hücrelerinin proliferasyonu, invazyonu, metastazı, anjiyogenezi ve apoptozisin baskılanmasını sağladığını ayrıca kemoterapiye karşı ilaç dirençliliğinin gelişiminde de rol aldığını göstermiştir. [68,83-87].

HSP27'nin artan ifadesinin kansere ek olarak kalp hastalıkları Ateroskleroz, renal iskemi, tip2 diyabet ve nörodejeneratif hastalıklarlada ilişkisi gösterilmiştir [59,78]. Ayrıca HSP27 gözde katarakt oluşumu, parkinson ve Alzhemier hastalığının patofizyolojisinde rol oynamaktadırlar [88].

2.10.2.2 HSP27 ve apoptosis

Apoptosis DNA hasarı, büyüme faktörlerinin eksikliği, hipoksi ve sitotoksik ilaçlar gibi birçok uyarıcı tarafından indüklenen programlanmış bir hücre ölümüdür. İlginç olan, aynı uyaranlar hücrede HSP'lerin ifade olmasına ve hücrede birikmesine neden olur ki, sonuçta HSP'ler sayesinde hücrede ölüm uyaranlarına karşı koruyucu bir yanıt oluşur. Son yıllarda yapılan birçok çalışma HSP'lerin antiapoptotik fonksiyona sahip olduğunu göstermiştir [85-88]. Buna ek olarak HSP'lerin apoptotik moleküller aracılığıyla hücre ölümünü bloke ederek, hücrelerin hayattta kalmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını sağladığına işaret edilmiştir [89].

Hücrelerde sitotoksik ilaçlarla olan tedavi sonrasında apoptosiz sık görülmektedir. Apoptosiz intrinsik (mitokondriyal yol) ve ekstrinsik (ölüm reseptörleri yolu) olarak ikiye ayrılmaktadır. HSPler kaspaz aktivitesine doğrudan ya da dolaylı olarak müdahale ederek apoptosisi bloke ederler.

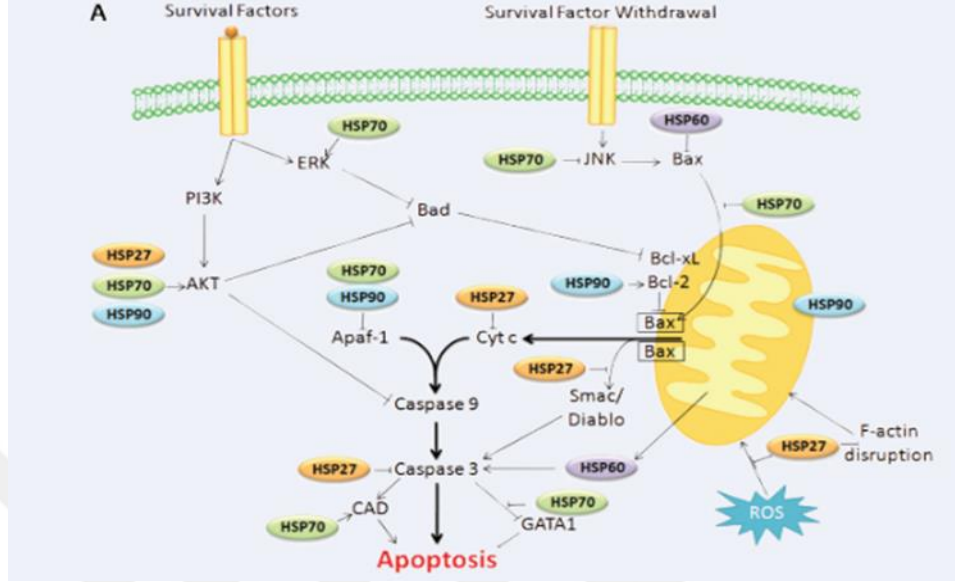
İntrinsik yol, hücre içi stres sinyalleri aracılığıyla proapoptotik moleküllerin üretimini veya aktivasyonunu gerektirir. İntrinsik yolak sitokrom c'ye bağımlı kaspaz aktivasyonunu temel alır. İntrinsik yolak Bcl-2 (B hücresi lenfositik-lösemi proto-onkogen) protein ailesinin kontrolü altında mitokondriyal apoptojenik moleküllerin serbest kalması ile gerçekleşir. Bcl-2 protein ailesi, Bcl-2 ve Bcl-xL gibi antiapoptotik üyeleri, Bax ve Bak başta olmak üzere birçok pro-apoptotik üyeleri içerir. HSP27'nin mitokondriden sitokrom c salınımını önleyebildiği gösterilmiştir [65,90,91]. Ayrıca HSP27'nin dolaylı olarak PI3K-AKT aracılığı proapoptotik Bax'ın fosforilasyonuna katıldığı bildirilmiştir. Bax'ın fosforile olması mitokondri membranında por oluşmasını önlediği için sitokrom c'nin salınımını engelleyerek apoptosizin bloke olmasını sağlar [92-95].

Ekstrinsik yol, ölüm reseptörleri olarak bilinen TNF α ve Fas reseptör ailesinin plazma membran proteinleri aracılığıyla tetiklenen apoptosiz yolağıdır. HSP27'nin ekstrinsik yolakta görev alan Bid proteinin mitokondriyal membrana translokasyonu önleyerek apoptosizi bloke ettiği gösterilmiştir [92,93]. HSP27 ayrıca DAXX (ölüm alanı ile ilişkili protein 6) ile doğrudan etkileşime girerek kaspaz aracılığıyla apoptosiz inhibe eder [83, 85].

Yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi, reaktif oksijen türleri (ROS) ve DNA hasarı dahil olmak üzere çeşitli hücresel stres koşulları HSP27, HSP70, HSP60 ve HSP90'ın aşırı ekspresyonuna neden olarak doğrudan ya da dolaylı olarak apoptosizin inhibisyonuna yol açar [85,91].

Kaspaz aracılı apoptozun inhibisyonu ile ilgili olarak, HSP27 ya doğrudan kaspaz-3 veya sitokrom c ile etkileşerek ya da AKT'yi aktive eden PI3-kinaz ifadesini artırarak işlev yapmaktadır. Ayrıca AKT ile indüklenen AKT/Bax etkileşim sonunda Bax'ın mitokondriye translokasyonunu engellenir. Multiple miyelom hücre hatları ile yapılan çalışmalarda, HSP27'nin doğrudan Smac (mitokondri türevli kaspaz aktivatörü) ile etkileşime girdiği ve bu nedenle kaspaz-3'ün aktivasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur.

HSP27 ayrıca hücre döngüsünün kontrolünde rol alan siklin bağımlı kinaz inhibitörü p21'in düzenlediği bilinen p53'ü de inaktive eder. Bu durum p21 fosforilasyonuna ve sonuçta hücre sağkalımının artmasına neden olur (Şekil 2.8) [60,90].



Şekil 2.8. HSP27'nin apoptosisteki rolü [60].

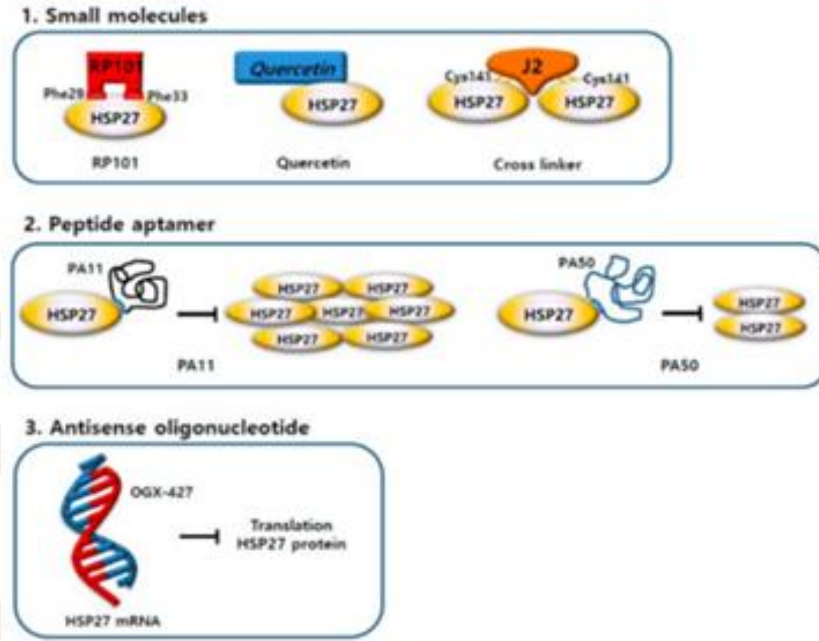
2.10.2.3 HSP27'nin kanserdeki rolü

Yapılan birçok çalışma HSP27'in birçok kanser türünde aşırı derecede ifade edildiğini ve kanser tanısında biyobelirteç olarak kullanılabileceğini önermiştir [6,65,81-87]. Meme, karaciğer, kolon, pankreas, tiroit, oral skuamöz hücreli karsinoma, akut miyeloid lösemi, miyelodisplastik sendrom ve multiple myeloma gibi birçok kanser türünde HSP27'nin artan ekspresyon seviyeleri saptanmıştır. Bunun yanı sıra yüksek düzeyde ifade edilen HSP27'nin kanser vakalarında kötü prognoz ile ilgili olduğu rapor edilmiştir [64,79,96]. Bu nedenle HSP27 inhibisyonunun kanser terapisi için hedef bir tedavi olabileceği önerilir [83,97].

HSP27 kanser hücrelerinde apoptosisi baskıladığı için tümör hücrelerinin kemoterapi ve radyoterapiye duyarlılığını azalttığı gösterilmiştir [83]. Yapılan çalışmalarda kemoterapiye karşı gelişen direnç mekanizmasında rol aldığı gösterilmiştir. Bu sonuç özellikle mide ve pankreas kanserlerinde mevcut kemoterapiye karşı dirençli hücrelerde HSP27 inhibitörleri ile kombine ilaç tedavisinin uygulandığı çalışmalarla gösterilmiştir [18, 96].

2.10.2.4 HSP27 inhibitörleri ve kanser tedavisi

HSP27 inhibisyonu kanser tedavisi için bir hedeftir. HSP27 inhibisyonu için küçük molekül, protein aptamerler ve antisens oligonükleotitlerden oluşan 3 farklı strateji vardır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. HSP27 inhibitörleri [79].

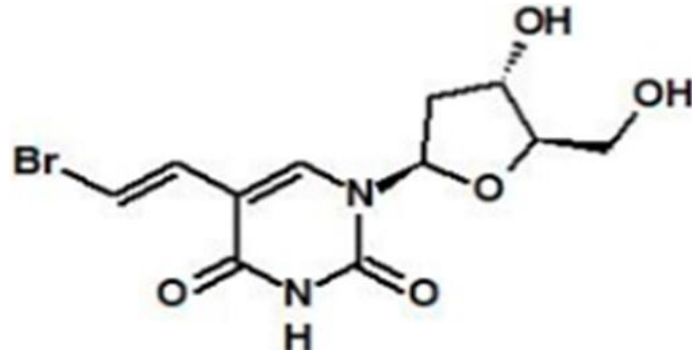
Antisens oligonükleotitler, HSP27 mRNA'sına bağlanarak HSP27 ifadesini baskırlar. HSP27'yi hedef alan antisens oligonükleotit olan OGX-427 (apatorsen)'in Faz I klinik denemesinde, fare prostat kanseri modelinde tümör metastazını azalttığı ve metastatik prostat kanserli hastalarda dolaşımdaki tümör hücrelerinin sayısını azalttığı gösterilmiştir [65]. Günümüzde OGX-427'nin Faz II klinik denemeleri devam etmektedir [79].

Protein aptamerleri, hedef proteinine bağlanan küçük amino asit dizileridir. Hedef proteinlere bağlanarak dimerizasyon ve polimerizasyonu bozarak inhibisyona neden olurlar. PA11 ve PA50 HSP27 inhibisyonu için dizayn edilmiş iki protein aptameridir. PA11, HSP27 oligomerizasyonunu, PA50 ise HSP27 dimerizasyonunu inhibe ederek inhibisyona neden olur [79,97].

HSP27 inhibisyonuna neden olan küçük moleküllü inhibitörler Brivudine (RP101), quercetin ve J2 (5-hydroxy-2-methyl-7-(thiiran-2-ylmethoxy) chromen-4-one)'dir. Quercetin, bitkilerde yaygın olarak bulunan biyoflavonoiddir. Birçok kanser türünde HSF1 bağımlı HSP'leri hedef alarak antitümör aktiviteye neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca sisplatin ve gemcitabine gibi kemoterapik ajanlarla kombine kullanıldığında sitotoksik aktiviteyi artırdığı ve kemoterapiye karşı gelişen direnç mekanizmasını kırdığı gösterilmiştir [18,98,99]. J2 kimyasal olarak sentezlenmiş olup, HSP27 proteinine bağlanarak protein yapısını bozar ve inhibisyona neden olur [79].

2.10.2.5 Brivudine

Brivudin (BRVD) bromovinildeoksiüridin olarak bilinir. Aynı zamanda RP101 olarak da adlandırılır. Brivudin bir timin nükleozit analogudur. HSP27'nin Phe29 ve Phe33 rezidülerine bağlanarak HSP27 fonksiyonunu inhibe edebilen bir nükleozittir. BRVD, HSP27'ye bağlandığında proteinin AKT, pro-kaspaz 3 ve sitokrom c gibi hedef proteinlerine bağlanmasını zayıflatır ve bu da apoptosisi tetikler. Bu nedenle, BRVD doğrudan kanser önleyici ve diğer kemoterapötik ilaçlara karşı kemo-duyarlılaştırıcı bir ajan olarak işlev görür (Şekil2.10) [9,17,79].



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Kimyasallar, Reaktifler ve Genler

Sunulan tez çalışmasında; Brivudine ((E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine; BRVD, MedChemExpres'ten 25 mg), Bortezomib (VELCADE™ 3,5mg), L-Glutamine içeren RPMI-1640 besiyeri, Penisilin/Streptomisin (10.000 U/mL penisilin, 10.000 µg/mL streptomisin) karışımı, Dulbeccos phosphate buffered saline (DPBS), %0.4 trypan blue (Gibco), Fetal bovine serum (FBS) (PAN), MTT (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ve Dimetilsülfoksit (Serva), Agaroz, Tris-baz, Etilen diamin asetik asit (EDTA) ve Borik asit (Sigma), cDNA sentez kiti (Fermentase), RNA izolasyon kiti (Ambion Life Technologies), SYBR Green Supermix (BioRad) satın alma yoluyla temin edilmiştir.

Aşağıda sekansları verilen insan HSP27 ve β -aktin genleri için primerler Sentebiolab'a özel olarak sentezlettirilmiştir.

HSP27 için primer seti;

F-5'- GTC CCT GGA TGT CAA CCA CT (Tm=54)

R-5'- GAC TGG GAT GGT GAT CTC GT (Tm=54)

β -aktin için primer seti;

F-5'- CCC AGC ACA ATG AAG ATC AAG ATC (Tm=64)

R-5'-GGG TGT AAC GCA ACT AAG TCA TAG TC (Tm=66)

3.2 Hücre Hatlarının Çoğaltılması

Bu tez çalışmasında Multiple Myeloma insan U-266 ve RPMI-8226 hücre hatları kullanılmıştır. İlk olarak donmuş haldeki U-266 ve RPMI-8226 hücre hatları 37°C su banyosunda çok hızlı bir şekilde çözöldü. Ortamdaki DMSO'nun uzaklaştırılması için oda sıcaklığındaki Fosfat Tamponu (PBS) ile hücreler 800 x g'de 5dk santrifüj edilerek 2 kez yıkandı. Hücre hatları ısı ile inaktive edilmiş %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve L-glutamin içeren RPMI-1640 üreme besiyerinin 5mL ile süspanse edilerek 25'lik flakslara ekildi. Hücreler 37°C'de, %5CO₂ ve %95 nem varlığında CO₂ etüvde çoğaltıldı. Üreyen hücrelerin morfolojisi düzenli olarak

inverted mikroskopta kontrol edildi. Hücreler flaks yüzeyini tamamen kapladıktan sonra besiyeri değiştirilerek 1/2 veya 1/3 oranında pasajlandı. Çoğalan hücrelerin canlılığı ve miktarı, tripan mavisini kullanılarak inverted mikroskopta thoma lamı ile hücre sayımı yapılarak kontrol edildi. Hücre hatlarının bir kısmı diğer çalışmalarda kullanılmak, stok hücre hattı oluşturmak için donduruldu.

3.3 Hücre Hatlarının Dondurulması

Stok hücre hattı oluşturmak için hücreler dondurma işlemine tabi tutuldu. Çoğalan hücre hatlarının dondurulması için %20 besiyeri, %10 DMSO ve %70 FBS içeren besiyeri hazırlandı. Tripan mavisini ile total hücre sayısı ve canlılığı hesaplanan hücreler donma mediası ile süspanse edildi. Dondurulan hücrelerin canlılığın en az %90 olmasına dikkat edildi. Dondurma işlemlerinin tamamı buz üzerinde çalışıldı. Donma mediası içindeki hücreler her bir karyovialde 1×10^6 - 2×10^6 hücre/mL olacak şekilde dağıtıldı. Karyovialler -80°C de 24 saat inkübe edildi ve sonrasında sıvı azot tankına alınarak saklandı.

3.4 Hücre Canlılığının Saptanması

Hücre canlılığını saptamak için ilk olarak hücreler flakstan toplandı ve 15'lik tüplere alınarak 800 x g'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant döküldü. Tüpte toplanan hücreleri yıkamak için hücrelerin üzerine 10ml PBS eklendi ve 800 x g'de 5dk santrifüj edilerek süpernatant döküldü. Bu işlem 2 kez tekrarlandı. Sonrasında 15'lik falkonun dibinde kalan pelete 1mL L-Glutamine içeren RPMI-1640 besiyeri eklenerek hücreler süspanse hale getirildi. Süspanse edilen hücrelerden 10 μL alındı ve farklı bir ependorf tüpüne aktarıldı. Ardından %0,4 tripan mavisinden 10 μL alınarak eklendi ve ependorf tüpünde dikkatli bir şekilde iyice karışması için pipetaj yapıldıktan sonra önceden %70 etil alkol ile temizlenip hazırlanan. thoma lamına 10 μL olacak şekilde eklendi. İnverted mikroskop altında canlı ve ölü hücre sayımı yapılarak mL'deki hücre sayısı hesaplandı. Canlı ve ölü hücre sayımı için aşağıdaki eşitlik kullanıldı.

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

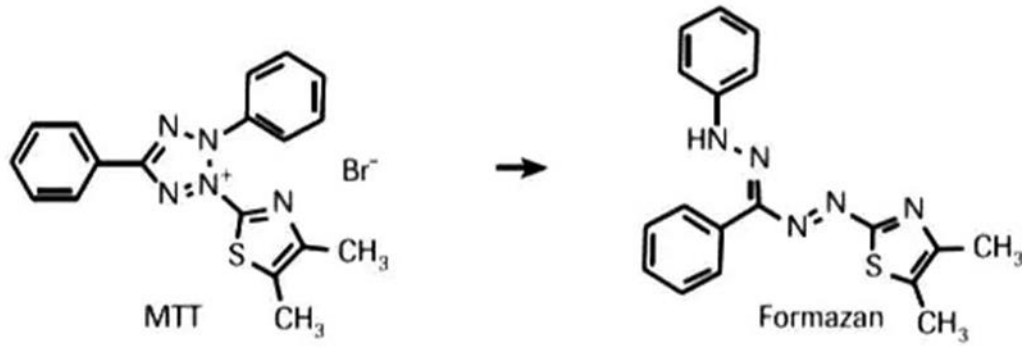
HS: Ortalama Canlı Hücre Sayısı

SF: Sulandırma Faktörü

$$\% \text{ Canlılık} = (\text{Canlı Hücre Sayısı} / \text{Toplam Hücre Sayısı}) \times 100$$

3.5 Sitotoksitenin Belirlenmesi (MTT Test)

MTT test hücre canlılığını saptamak ve sitotoksiteyi ölçmek için kullanılan spektrofotometrik bir yöntemdir. MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolyum bromür) suda çözünen bir tetrazolium tuzudur. MTT testinin çalışma prensibi hücre içine endositosizle ile giren sarı renkli suda çözünmeyen MTT boyasının canlı hücrelerdeki NAD(P)H- bağımlı hücresel dehidrojenaz enzimleri ile suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine indirgenmesini temel alır (Şekil 3.1). Canlı hücrelerde mitokondriyal aktivite sabit olduğu için hücre sayısındaki artış veya azalma mitokondriyal aktivite ile doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan kristallerinin DMSO ya da izopropanol gibi bir çözücü ile çözünmesinden sonra oluşan mor rengin spektrofotometrik olarak okunması doğrudan canlı hücre sayısını gösterir.



Şekil 3.1. Sarı tetrazolyum boyası MTT' nin mor renkli formazana indirgemesi [102].

- MTT test için aşağıdaki basamaklar sırasıyla uygulandı
- 96 kuyucuklu mikroplyetlere kuyucuk başında 1×10^5 /100 μ L olacak şekilde hücreler kör olan hücrenin bulunmadığı kuyucuk hariç dağıtıldı
- Hücreler 37 °C'de, %5 CO₂ ve %95 nem varlığında CO₂ etüvde gece boyu inkübe edildi
- Sitotoksiteyi değerlendirmek amacıyla stok çözeltiden sulandırılarak hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki test kimyasalı kuyucuklara eklendi ve total hacmi 200 μ L'ye tamamlayacak şekilde besiyeri ilave edildi.
- 200 μ L tamamlanan pleyt 37 °C'de %5 CO₂ ve %95 nem varlığında 48 saat inkübe edildi.
- Taze olarak PBS içerisinde 5mg/mL MTT solüsyonu hazırlandı ve 0,2 mikronluk filtreden geçirildi.

- Hazırlanan MTT solüsyonu her kuyucuğa 20 µL olacak şekilde dağıtıldı ve pleytler CO₂ etüvde 4 saat inkübe edildi.
- Kuyucuklarda oluşan formazan kristalleri mikroskop altında görüntülendi.
- Sonrasında pleytler pleyt santrifüj cihazında 25 °C’de 10dk santrifüj edildi.
- Kuyucuklardaki besiyeri hücreleri kaldırmadan aspire edildi.
- Her bir kuyucuğa 100 µL DMSO eklenerek oluşan formazan kristallerin çözünmesi için 15-20dk beklendi.

Açığa çıkan renk Chromate Eliza okuyucuda 492 nm dalga boyunda okundu.

3.5.1 Bortezomib uygulanması

Bortezomib’in U266 ve RPMI-8226 hücreleri üzerindeki % canlılığa etkileri MTT test uygulanarak saptandı. Bortezomib steril enjektör su ile çözülerek, 2mM’lık stok çözelti hazırlandı. Stok çözeltiden seri sulandırım yapılarak 100 nM, 50 nM, 25nM, 12.5 nM, 6.25 nM ve 3.125 nM oluşan farklı çalışma konsantrasyonları hazırlandı ve MTT test yapıldı. MTT testte her konsantrasyon için 96’lık mikropleytte 8 kuyucuk uygulandı ve hücreler kimyasalla 48 saat inkübe edildi. Farklı zaman aralıklarında her deney en az 3 kez tekrarlandı. Deneylerin ortalaması alınarak her doz için % canlılık değerleri hesaplandı ve doza karşı % canlılık grafikleri çizildi. Ayrıca çalışılan konsantrasyonlar eşit birim aralıklarında olmadığı için konsantrasyonların logaritmasına karşılık % canlılık değerleri grafiklendi ve %50 inhibisyona neden olan Bortezomib’in IC50 değeri saptandı.

3.5.2 Brivudin uygulanması

Brivudin’in U266 ve RPMI-8226 hücreleri üzerindeki % canlılığa etkileri MTT test uygulanarak saptandı. Brivudine PBS ile çözülerek, 2mM’lık stok çözelti hazırlandı. Stok çözeltiden seri sulandırım yapılarak 120 µM, 60 µM, 30 µM, 15 µM, 7,5µM ve 3.75 µM’den oluşan farklı çalışma konsantrasyonları hazırlanarak MTT test yapıldı. MTT testte her konsantrasyon için 96’lık mikropleytte 8 kuyucuk uygulandı ve hücreler kimyasalla 48 saat inkübe edildi. Farklı zaman aralıklarında her deney en az 3 kez tekrarlandı. Deneylerin ortalaması alınarak her doz için % canlılık değerleri hesaplandı ve doza karşı % canlılık grafikleri çizildi. Ayrıca çalışılan

konsantrasyonların logaritmasına karşılık % canlılık değerleri grafiklendi ve %50 inhibisyona neden olan BRVD dozu (IC50) değerleri saptandı.

3.5.3 Kombine ilaç uygulanması

Bortezomib bugün myeloma tedavisinde halen kullanılan bir ilaçtır. Ancak bortezomibe karşı direnç gelişmesi tedaviyi imkansızlaştıran en önemli sorunlardan birisidir. Direnç gelişimine karşı en etkin tedavi seçeneklerinden birisi kombine ilaç tedavisi uygulamaktır. Bu nedenle çalışmanın bu basamağında bortezomibin IC50 dozu sabit, brivudin konsantrasyonu değiştirilerek kombine ilaç tedavisi uygulandı. İlaçlar eş zamanlı olarak

Bortezomib (IC50 $\cong$ 12,5nM) + Brivudin (30 μ M, 22,5 μ M, 15 μ M, 7,5 μ M, 3,75 μ M) kombinasyonları şeklinde her iki hücre hattına uygulanarak MTT test yapıldı ve her kombine doz için % canlılık değerleri hesaplandı.

İlaç-ilaç etkileşiminin değerlendirilmesi tıbbın tüm alanlarında önemlidir. İlaç etkileşiminin doğası ve kapsamı genellikle in vitro çalışmalarda belirlenir. İlaç-ilaç etkileşimi için yaygın olarak kullanılan izobologram analizi, yüzey cevap analizi ve kombinasyon indeks analizi gibi birkaç tane matematiksel modelleme vardır [103,104].

Kombinasyon indeks analizi izobologram analizine benzer şekilde ilaç etkileşiminin doğası hakkında nitel bir bilgi sağlar ve aşağıdaki eşitlik kullanılarak elde edilen sayısal bir değer olan CI (kombinasyon indeksi) ile de ilaç etkileşimi için nicel bir ölçü verir.

$$CI = \frac{C_{A,x}}{IC_{x,A}} + \frac{C_{B,x}}{IC_{x,B}} \quad (3.1)$$

$C_{A,x}$ = % x ilaç etkisi elde etmek için kombinasyon halinde kullanılan A ilacını konsantrasyonu

$C_{B,x}$ = % x ilaç etkisi elde etmek için kombinasyon halinde kullanılan B ilacını konsantrasyonu

$IC_{x,A}$ = A ilacının tek başına kullanıldığında %x etkiye neden olduğu konsantrasyon.

$IC_{x,B}$ = B ilacının tek başına kullanıldığında %x etkiye neden olduğu konsantrasyon.

Yukarıdaki eşitlikten iki ilacın etkileşimi için bulunan CI değeri; CI=1 ise additif, CI<1'den küçükse sinerjistik ve CI>1'den büyükse antagonistik olarak tanımlanır [103,104].

3.6 RNA İzolasyonu

U266 ve RPMI-8226 hücreleri 6 kuyucuklu mikropleytlere kuyucuk başında 2×10^6 /2mL olacak dağıtıldı ve farklı çalışma konsantrasyonlarından oluşan test kimyasalları uygulandı. Hücreler 37 °C'de, %5 CO₂ ve %95 nem varlığında CO₂ etüvde 48 saat inkübe edildi. RNA izolasyonunu gerçekleştirmek için spin kolon yöntemini kullanan Ambion PureLink mini RNA izolasyon kiti kullanıldı. RNA izolasyonu için aşağıdaki basamaklar sırasıyla uygulandı.

- İşlemlere başlamadan önce tüm pipet uçları otomatik pipetler ependorf tüpler 121 °C'de 90dk otoklavlandı ve işlemin gerçekleştirileceği yüzey %70'lik etil alkol ile temizlendi.
- RNA izolasyonu için 6'lık mikropleytlerdeki hücreler 15mL'lik tüplere toplanarak 2000 x g'de, 4°C de 5 dk santifüj edildi ve ependorf tüplerine alındı.
- %1'lik 2-merkaptoetanol eklenerek taze hazırlanan Lizis Buffer'dan 0.6 mL hücrelerin üzerine eklendi ve peletin dağılması için pelet görünmez olana kadar vorteksleme işlemi gerçekleştirildi.
- Her tüpe 1:1 hacimde %70'lik etil alkol eklendi ve spin kolon tüplerine alındı. Spin kolonlar 700 µL hacim aldığı için hepsine 700 µL hücre lizatu eklendi ve 12000 x g'de 45 sn santrifüj edildi. Kalan hücre lizatu tekrar eklenerek santrifüj edildi. Her işlem sonucunda alt faz döküldü.
- Spin kolonlara %96-100'lük etanol içeren "Wash Buffer I" den 700 µL eklendi ve oda sıcaklığında 12000 x g'de 45sn santrifüj edildi, alt faz toplama tüpleriyle birlikte atıldı ve toplama tüpü değiştirildi.
- Spin kolonların üzerine 500 µL Wash Buffer II eklendi. Örnekler oda sıcaklığında 12000 x g'de 45sn santrifüj edildi ve tekrar toplama tüpüyle birlikte alt faz atıldı.
- Spin kolonları içeren koleksiyon tüpleri oda sıcaklığında 12.000 x g'de 2 dk boş santrifüj edildi.
- Koleksiyon tüpleri toplama tüpleriyle değiştirildi. Tüpün içerisinde bulunan filtreli kısmın tam ortasına gelecek şekilde RNase-Free sudan 50 µL eklendi ve birkaç dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

- Son olarak 12.000 x g' de 2 dk santrifüj yapıldı.
- Nanodrop 2000 (Thermo) cihazında izole edilen RNA'ların miktarı ve saflığına bakıldı.

İdeal bir RNA izolasyonun da 260/280 absorbans değeri yaklaşık olarak 1.8 ve 2.0 değer aralığında olması beklenmektedir. Bunun için 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbans ölçümleri yapıldı.

3.7 Agaroz Jel Elektrophorezi

İzole edilen RNA'ların saflığını kontrol etmek ve izolasyonu doğrulamak için agaroz jel elektrophorezi yapıldı. Bu yöntem için ilk olarak 1 x TBE tamponu hazırlandı. 1xTBE için 12,11 gr tris-baz, 5,56 gr borik asit, 0,7 gr EDTA 1000ml distile suda çözüldü ve pH = 8,3'e ayarlandı. TBE tamponu içinde %1'lik agaroz çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözelti mikrodalgada eritildi ve içerisine EtBr eklendikten sonra jel elektrophorez tankına döküldü. Örnekler jele yüklendikten sonra 1 x TBE (pH = 8,3) yürütme tamponunda 100 V'da yürütüldü. Sonrasında örnekler jel görüntüleme cihazında görüntülendi.

3.8 cDNA Sentezi (Reverse Transkripsiyon Reaksiyonu)

Konsantrasyonu ölçülmüş ve saflığı kontrol edilmiş izole edilen RNA'lardan cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentezi için tüm total RNA'lardan 1 µg/mL kullanıldı. Sentez için cDNA sentez kiti (Fermantase) kullanılarak kitin önerdiği şekilde reaksiyon tüpleri hazırlandı.

Tek bir reaksiyon için:

10 x RT Buffer	2µL
dNTP Mix (2,5mM)	0,8µL
Random hexamer (50µM)	2µL
Reverse transkriptaz (200 U/µL)	1µL
RNase free su	4,2 µL

alınarak toplam total hacim 10µL'ye tamamlandı. Hazırlanan karışımın üzerine son hacim 20 µL olacak şekilde total RNA'lardan 1 µg/mL olacak şekilde 10µL RNA

örneği eklendi. Her bir örnek için bu işlemler tek tek uygulandı. Aşağıdaki protokol kullanılarak PCR cihazında cDNA sentezi gerçekleştirildi.

1. Basamak 25 °C'de 10dk
2. Basamak 37 °C'de 120dk
3. Basamak 85 °C'de 5dk
4. Basamak 4 °C'de (∞)

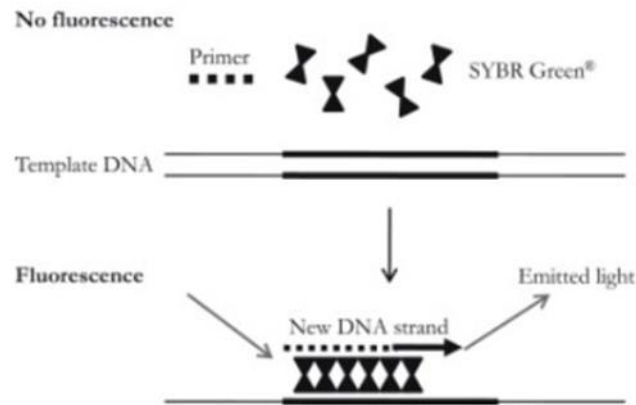
Sentez sonrası örnekler cihazdan alınarak RT-PCR aşamasında kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

3.9 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real time-PCR)

Real-Time PCR ve Real Time Reverse transkriptaz PCR (Real time RT-PCR) yöntemleri gen ifadesini yüksek doğrulukta ölçmek için yaygın şekilde kullanılırlar. Geleneksel PCR'de, amplifiye olmuş DNA ürünü veya ampikon, bir son nokta analizinde saptanır. Gerçek zamanlı PCR'da, amplifikasyon ürününün birikimi, reaksiyon ilerledikçe, her döngüden sonra ürün miktar tayini ile gerçek zamanlı olarak ölçülür PCR ürünlerinin gerçek zamanlı tespiti, reaksiyon ortamına floresan ışıma yapan floresan raportör moleküllerinin dahil edilmesiyle sağlanır. Bu amaç için kullanılan floresan kimyalar, DNA bağlayıcı boyalar, floresan olarak işaretlenmiş diziye özgü primerler veya problemlerden oluşur. Reaksiyonlarda floresan sinyal kaynağı olarak hidroliz problemleri, hibridizasyon problemleri, TaqMan® problemleri, Molecular Beacon® problemleri ve SYBR® Green I boyası gibi primerlere bağlı ya da primerlerden bağımsız floresan işaretleyiciler örnek olarak verilebilir. Amplifikasyon meydana geldikçe floresan sinyalini izlemek için floresan algılama modülleri ile donatılmış Real Time PCR cihazları kullanılır. Ölçülen floresan, ampikonun toplam miktarıyla orantılıdır, zamanla floresandaki değişim, her döngüde üretilen ampikon miktarını hesaplamak için kullanılır Ampikonun ilk tespit edildiği nokta eşik döngüsü olarak adlandırılır (Ct). Döngü sırasında ürün miktarı arttıkça floresans ışıma artar. Oluşan ışımlar bir süre artış gösterir devamında sabitlenerek plato fazına geçer. Temel olarak 4 aşamada gözlemlenir bunlar lineer zemin fazı, erken üstel faz, log-lineer (üstel olarak da bilinir) faz ve plato fazıdır RT-PCR'ın ana avantajı geleneksel PCR'ın aksine başlangıçtaki kalıp DNA'nın kopya sayısının saptanmasına izin vermesidir. Gerçek zamanlı PCR sonuçları, kalitatif (bir dizinin varlığı veya yokluğu) veya kantitatif

(kopya sayısı) olarak elde edilir. Kantitatif gerçek zamanlı PCR bu nedenle qPCR analizi olarak da bilinir. Ayrıca, gerçek zamanlı qPCR verilerin analizi için jel elektroforezi gibi basamakları gerektirmediği için çalışma süresinin azalmasına imkân sağlar.

Sunulan tez çalışmasında HSP27 gen ifade düzeyini saptamak için SYBR Green I boyası kullanılarak Real Time qPCR yapıldı. SYBR Green I çift zincirli DNA'ya bağlanan bir boyadır. Bu nedenle kantitatif PCR (qPCR)'da ampikon miktarını ölçmek için yaygın bir şekilde kullanılır. SYBR Green I çift zincirli DNA'nın minör oluşuna nükleotit dizisinden bağımsız bir şekilde bağlanırken tek zincirli DNA'ya bağlanmaz. Bağlandıktan sonra SYBR Green I 480nm dalga boyundaki deki mavi ışık ile uyarılır ve emisyon spektrumu maksimum 520nm dalga boyundaki floresan miktarı ile ölçülür. Boyanın çift zincirli DNA'ya bağlandıktan sonra yaptığı ışıma serbest boyanınkinden 1000 kat daha yüksektir. PCR sırasında hedef dizi amplifiye edilirken, her uzatma basamağında SYBR Green I çift zincirli DNA'nın tüm yeni kopyalarına bağlanır. Gerçek zamanlı olarak PCR izlendiğinde polimerizasyon adımı sırasında ışıma gözlenirken denatürasyon aşamasında ışıma da bir düşüş gözlenir. Şekil 3.2'de görüldüğü gibi her PCR döngüsünün uzama aşamasının sonunda floresans ışıma ölçülerek kantitasyon yapılır [105-107].



Şekil 3.2. SYBR Green'nin bağlanma reaksiyonu [105].

HSP27 gen ifadesini ölçmek için gene özgü primerler ve SYBR Green mix (Bio-Rad) kullanılarak ABİ 7500 Fast Real Time cihazında qPCR yapıldı. Endojen kontrol (referans gen) olarak, β aktin geni kullanıldı. Genlere özgü primer setleri aşağıda sekanslarıyla gösterilmiştir.

Hsp27 için;

F-5'- GTC CCT GGA TGT CAA CCA CT (T_m=54)

R-5'- GAC TGG GAT GGT GAT CTC GT (T_m=54)

β-aktin için;

F-5'- CCC AGC ACA ATG AAG ATC AAG ATC (T_m=64)

R-5'-GGG TGT AAC GCA ACT AAG TCA TAG TC (T_m=66)

Gen ifade düzeylerini ölçmek için ABI 7500 Fast cihazı kullanıldı ve aşağıdaki reaktifleri içeren karışım hazırlandı. Tek bir reaksiyonu için 2 x SYBR Green supermix (BioRad)'den 10µL, forward primer (10µM)'dan 0,5µL, reverse primerden(10µM)'dan 0,5µL, cDNA (40ng/rxn)'dan 2µL ve RNase free sudan 7µL eklenerek total hacim 20µL tamamlandı. Tüpler cihaza yerleştirildikten sonra aşağıda belirtilen programla amplifikasyon gerçekleştirildi.

1.Basamak

50°C 2 dk

95°C 10 dk

2.Basamak (40 döngü)

95°C 15sn

60°C 1dk

3.Basamak (melting curve)

60°C de 90°C

Gen ifade düzeyleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi kullanılarak analiz edildi [106].

$$\Delta C_t \text{ Test grubu} = C_t (\text{Hedef gen}) - C_t (\text{Referans gen})$$

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

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ Test grubu} - \Delta C_t \text{ Kontrol grubu}$$

$$\text{Gen İfade Düzeyi} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

3.10 İstatistiksel Analizler

Deneyisel veriler arasındaki anlamlı farklılıkları saptamak için SPSS istatistik 21 programı kullanılarak One-way ANOVA, Tukey multi comparison test yapıldı ve p değerleri hesaplandı. $p < 0,05$ olması durumu anlamlı olarak değerlendirildi.



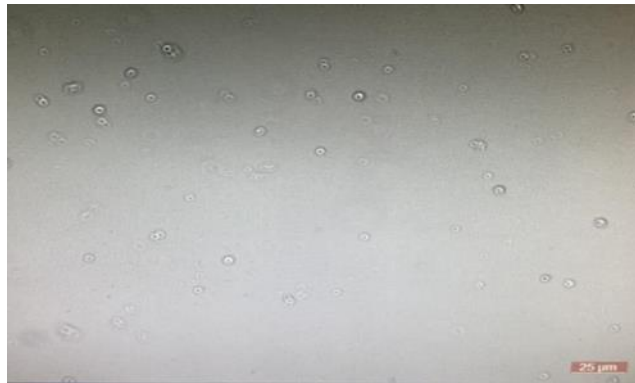
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Hücre Hatlarının Çoğaltılması

U266 ve RPMI-8226 hücre hatları ısı ile inaktive edilmiş %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve L glutamin içeren besiyeri kullanılarak %5 CO₂, 37 °C ve %95 nem koşullarında CO₂ etüvde çoğaltıldı. Hücrelerin üreme yoğunluğunu, morfolojisini ve kontaminasyon riskini takip etmek için hücreler düzenli olarak mikroskop altında kontrol edildi (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Hücreler arasında yapışma ve kirlilik olmaması için PBS ile düzenli olarak hücreler yıkandı. Hücreler flaksı tamamen kapladığında tripan mavisi ile boyama yapılarak hücre sayımı gerçekleştirildi ve haftada 2-3 kez 1/2 veya 1/3 oranında pasajlanarak 75'lik flaksa alındı.



Şekil 4.1. U266 hücrelerinin 25X büyütümüş görüntüsü



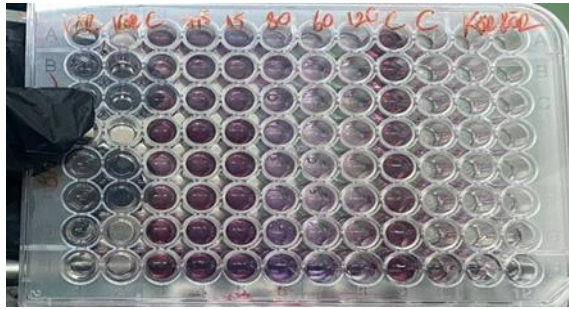
Şekil 4.2. RPMI-8226 hücrelerinin 25X büyütümüş görüntüsü

4.2 Hücre Canlılığının Saptanması (Sitotoksite Test)

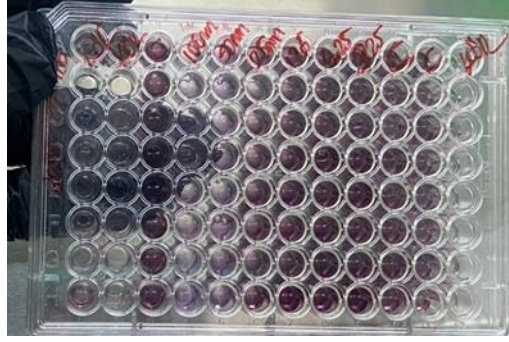
Bortezomib ve Brivudinin U266 ve RPMI-8226 hücre hatlarının % canlılıkları üzerine etkisi MTT test kullanılarak belirlendi. MTT boyasının canlı hücrelerde oluşturduğu formazan kristalleri DMSO ile çözülmeden önce mikroskop altında incelenerek (Şekil 4.3), test kimyasallarının doza bağlı canlılığa etkisi doğrudan görüntülendi. Hücrelerin MTT reaktifiyle 4 saatlik inkübasyonu sonrasında, formazan kristalleri DMSO ile çözülerek mor rengin açığa çıkması sağlandı. Oluşan renk Chromate eliza cihazında, 492 nm dalga boyunda okunarak ölçüm yapıldı (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5). Yapılan tüm deneylerde kör ve kontrol grubu oluşturuldu. Kimyasal uygulanan test grubuna ait ortalama deney datalarından kör çıkartılarak elde edilen değerlerin, kimyasal uygulanmamış kontrol grubuna oranlanmasıyla % canlılık değerleri hesaplandı. Kontrol grubu %100 olarak kabul edilip diğer test gruplarının % canlılık değerleri hesaplandı. Farklı gün ve zaman aralıklarında yapılan deneylerin ortalaması alındı ve standart sapmaları hesaplandı.



Şekil 4.3. MTT testte oluşan formazan kristallerinin görüntüsü.



Şekil 4.4. Brivudin ile muamele edilen U266 hücrelerinde MTT test plağının görüntüsü.



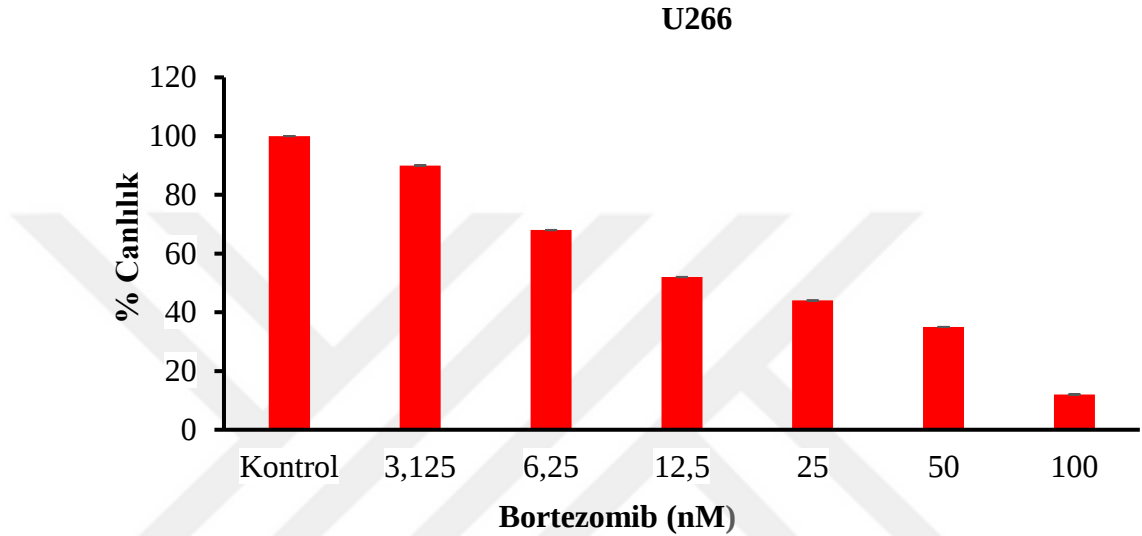
Şekil 4.5. Bortezomib ile muamele edilen U266 hücrelerinde MTT test plağının görüntüsü.

4.3 Bortezomibin U266 ve RPMI-8226 Hücre Hatlarındaki Sitotoksitesi

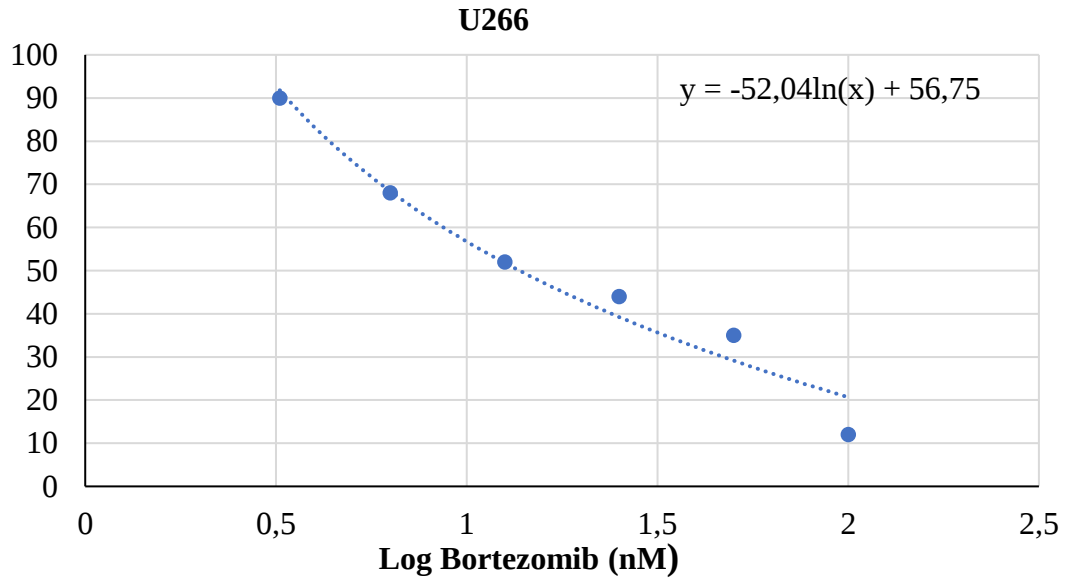
İnsan U266 ve RPMI-8226 MM hücre hatlarında bortezomibin IC₅₀ değerinin hesaplanması için 3,25 nM, 6,5 nM, 12,5 nM, 25 nM, 50 nM ve 100nM bortezomib konsantrasyonları çalışıldı (Çizelge 4.1, 4.2). Farklı zamanlarda yapılan deneylerde 96'lık mikroplyette her konsantrasyon dozu için 8 kuyucuk çalışıldı ve 48 saat inkübe edildi. Yapılan tüm deneylerin ortalaması alınarak IC₅₀ değerleri saptandı ve grafikleri çizildi. Şekil 4.6 ve Çizelge 4.1'de Bortezomibin U-266 hücrelerindeki % canlılığa etkisi görülmektedir. Kullanılan bortezomib konsantrasyonları eşit birim aralığında olmadığı için IC₅₀ dozunu daha doğru bir şekilde saptamaya imkân veren, Şekil 4.7'te görülen bortezomib konsantrasyonlarının logaritmasına karşılık % canlılık değerleri grafiklendi. Grafikteki eğilim çizgisi eşitliğinden bortezomibin U266 hücrelerinde 48 saat için IC₅₀ dozu 13,75 nM olarak hesaplandı. Şekil 4.7'te Bortezomib konsantrasyonunun logaritmasına karşılık U266 hücrelerindeki % canlılık değerleri görülmektedir. Şekil 4.8 ve Çizelge 4.2'de Bortezomibin RPMI-8226 hücrelerindeki % canlılığa etkisi görülmektedir. Şekil 4.9'te Bortezomib konsantrasyonunun logaritmasına karşılık RPMI-8226 hücrelerindeki % canlılık değerleri görülmektedir. Şekil 4.9'daki eşitlik kullanılarak bortezomibin RPMI-8226 hücrelerindeki 48 saatlik IC₅₀ dozu 11,22 nM olarak hesaplandı.

Çizelge 4.1. 48 saatlik bortezomib uygulamasının U266 hücre hattındaki % canlılık değerlerinin ortalaması ve standart sapmaları.

Bortezomib (nM)	0	3,125	6,25	12,5	25	50	100
% Canlılık	100±0,03	90,9±0,03	68,5±0,05	52,6±0,04	44,6±0,03	35,9±0,03	12±0,01



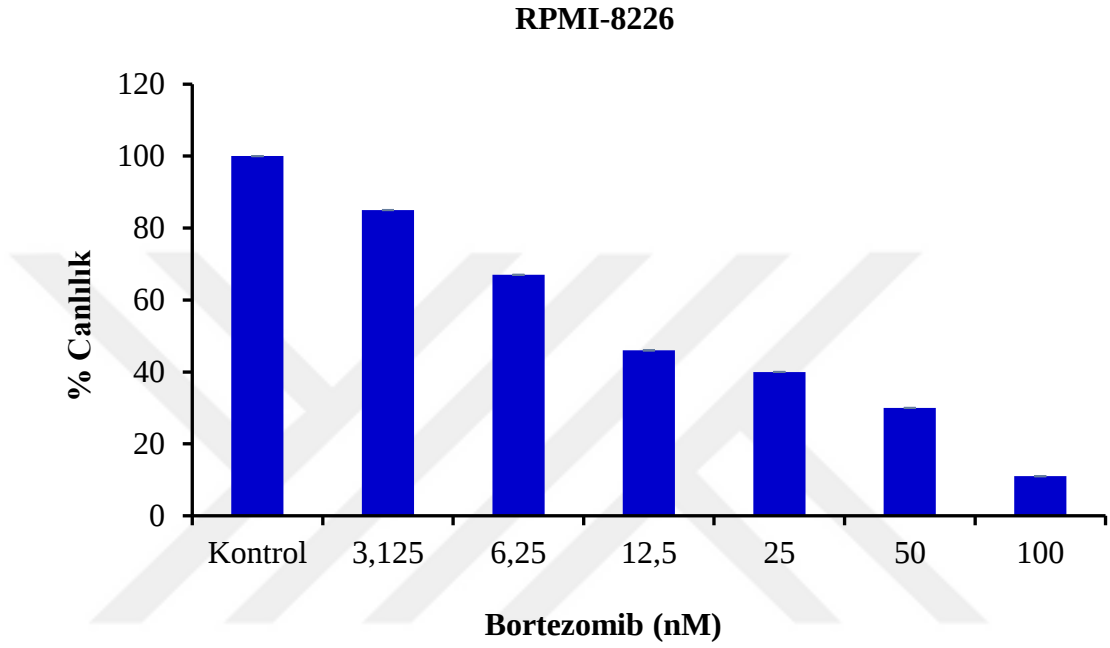
Şekil 4.6. Bortezomib uygulamasının U266 hücre hattındaki % canlılığa etkisi.



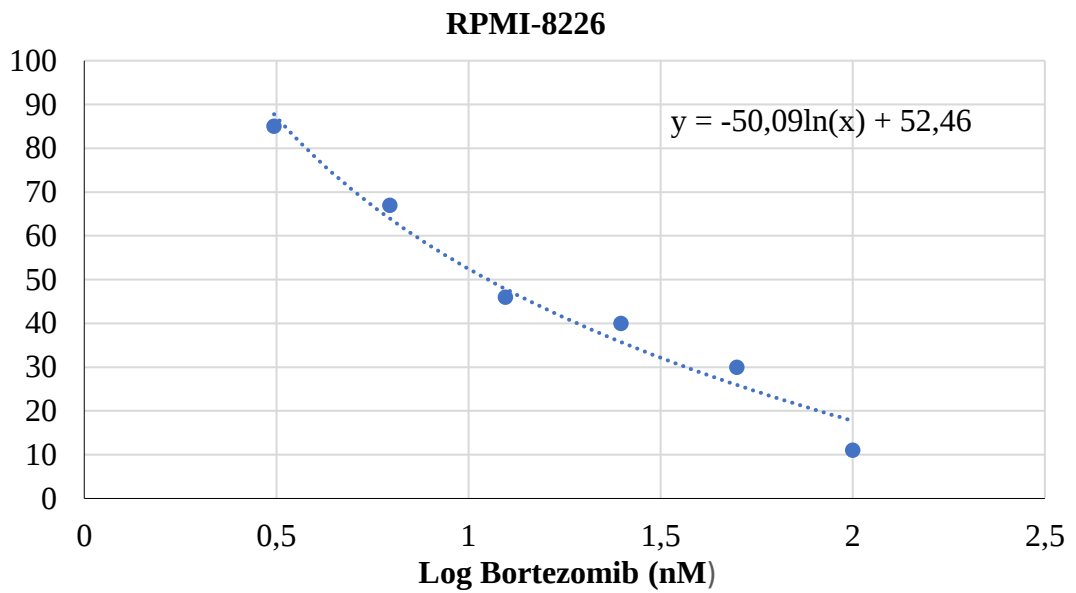
Şekil 4.7. Bortezomib konsantrasyonlarının logaritmasına karşılık U266 hücrelerinin % canlılığı.

Çizelge 4.2. 48 saatlik bortezomib uygulamasının RPMI-8226 hücre hattındaki % canlılık ortalamaları ve standart sapma değerleri.

Bortezomib (nM)	0	3,125	6,25	12,5	25	50	100
% Canlılık	100±0,00	85±0,03	67±0,03	46±0,06	40±0,02	30±0,02	11±0,01



Şekil 4.8. Bortezomib uygulamasının RPMI hücre hattındaki % canlılığa etkisi.



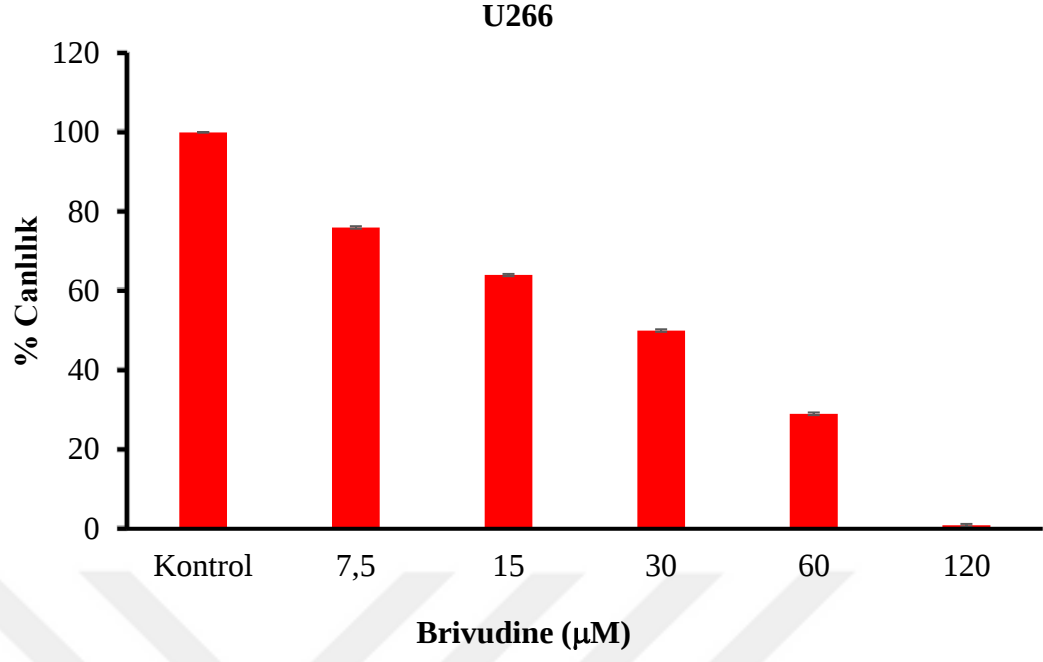
Şekil 4.9. Bortezomib konsantrasyonlarının logaritmasına karşılık RPMI-8226 hücrelerinin % canlılığı.

4.4 Brivudin uygulanması

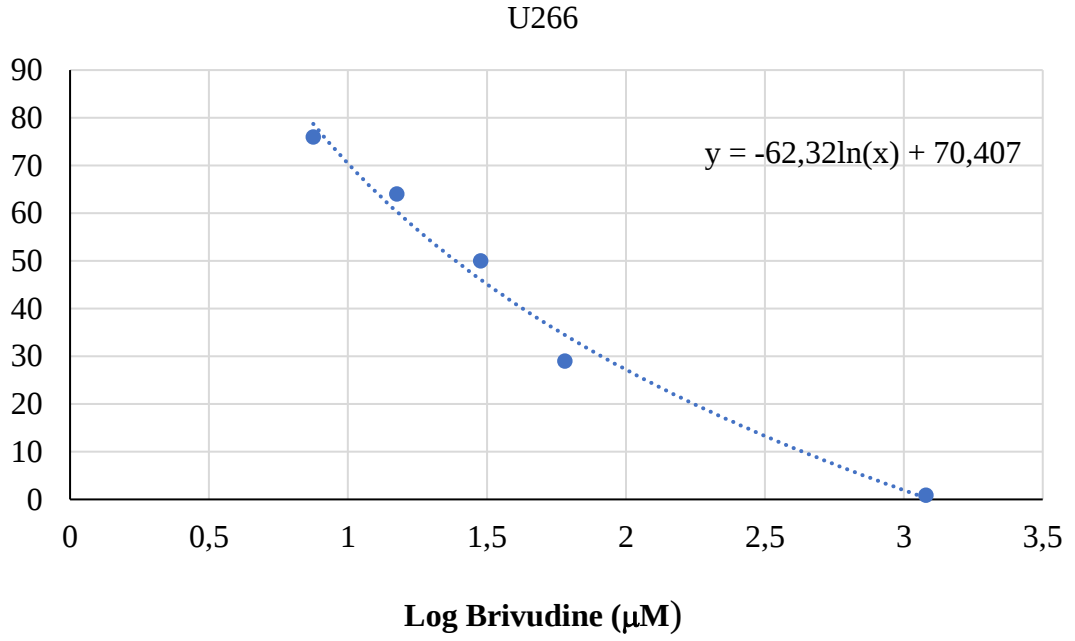
U266 ve RPMI-8226 MM hücre hatlarında brivudinin IC50 değerinin hesaplanması için 3,75 μ M, 7,5 μ M, 15 μ M, 30 μ M, 60 μ M ve 120 μ M brivudin konsantrasyonları çalışıldı (Çizelge 4.3- 4.4). Farklı zamanlarda yapılan deneylerde 96'lık mikroplyette her konsantrasyon dozu için 8 kuyucuk çalışıldı ve 48 saat inkübe edildi. Yapılan tüm deneylerin ortalaması alınarak IC50 değerleri saptandı ve grafikleri çizildi. Şekil 4.10 ve Çizelge 4.3'de Brivudinin U-266 hücrelerindeki % canlılığa etkisi görülmektedir. Şekil 4.11'de brivudin konsantrasyonlarının logaritmasına karşılık % canlılık değerleri grafiklendi. Grafikteki eğilim çizgisi eşitliğinden brivudinin U266 hücrelerinde 48 saat için IC50 dozu 24,39 μ M olarak hesaplandı. Şekil 4.12 ve Çizelge 4.4'de brivudinin RPMI-8226 hücrelerindeki % canlılığa etkisi görülmektedir. Şekil 4.13'te Brivudin konsantrasyonunun logaritmasına karşılık RPMI-8226 hücrelerindeki % canlılık değerleri görülmektedir. Şekil 4.13'deki eşitlik kullanılarak brivudinin RPMI-8226 hücrelerindeki 48 saatlik IC50 dozu 18,83 μ M hesaplandı.

Çizelge 4.3. 48 saatlik brivudin uygulamasının U266 hücre hattındaki % canlılık ortalamaları ve standart sapma değerleri

Brivudine (μ M)	0	7,5	15	30	60	120
% Canlılık	100 $\pm$ 0,07	76 $\pm$ 0,05	64 $\pm$ 0,03	50 $\pm$ 0,04	29 $\pm$ 0,04	0,9 $\pm$ 0,05



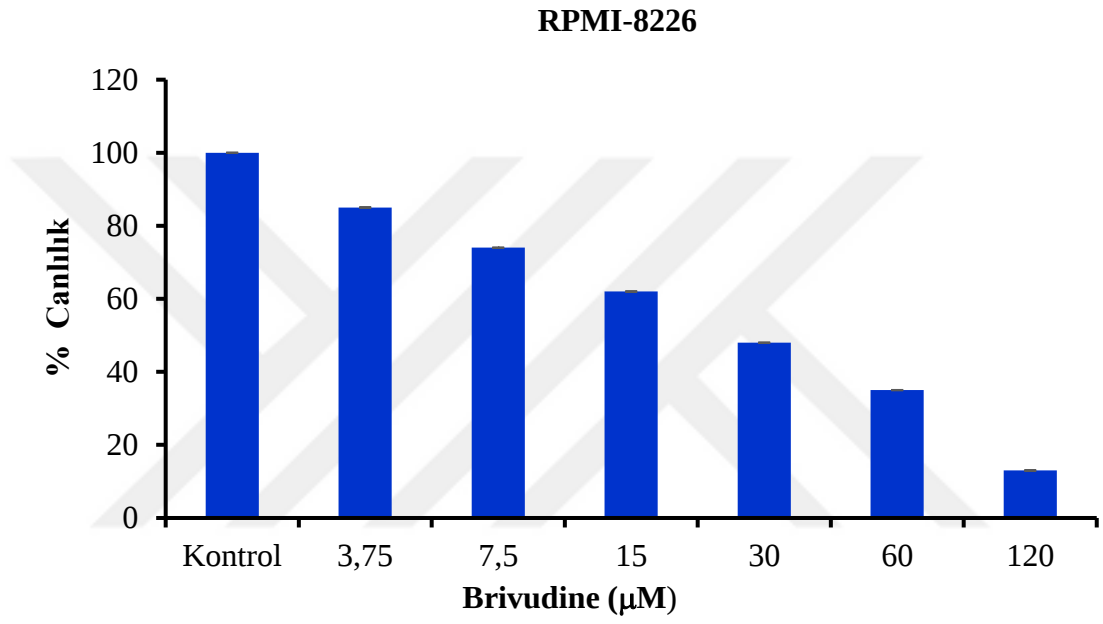
Şekil 4.10. Brivudin uygulamasının U266 hücre hattındaki % canlılığa etkisi.



Şekil 4.11. Brivudin konsantrasyonlarının logaritmasına karşılık U266 hücrelerinin % canlılığı

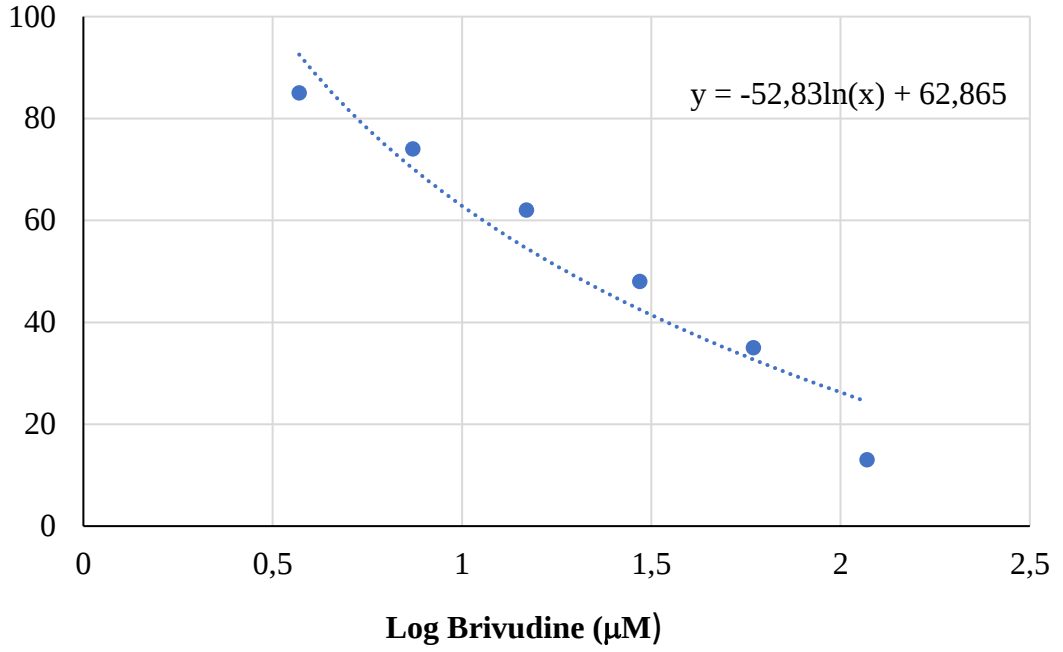
Çizelge 4.4. 48 saatlik brivudin uygulamasının RPMI-8226 hücre hattındaki % canlılık ortalamaları ve standart sapma değerleri

Brivudine (µM)	0	3,75	7,5	15	30	60	120
% Canlılık	100±0,07	85±0,05	74±0,03	62±0,04	48±0,04	35±0,05	13±0,02



Şekil 4.12. Brivudin uygulamasının RPMI-8226 hücre hattındaki % canlılığa etkisi.

RPMI-8226



Şekil 4.13. Brivudin konsantrasyonlarının logaritmasına karşılık RPMI-8226 hücrelerinin % canlılığı.

4.5 Kombine Çalışma

Bortezomibin U266 hücrelerindeki IC₅₀ dozu 13,75 nM, RPMI-8226 hücrelerindeki IC₅₀ dozu ise 11,22 nM bulundu. Kombinasyon çalışmalarımızda bortezomib dozu için her iki hücre hattında lineer canlılık grafiği içerisinde bulunan ve yaklaşık IC₅₀ dozuna denk gelen 12,5 nM konsantrasyonu sabit tutularak kombine ilaç uygulaması yapıldı. Bortezomib (IC₅₀ $\cong$ 12,5nM) + Brivudin (3,75µM, 7,5 µM, 15 µM, 22,5 µM, 30µM) kombinasyonları her iki hücre hattında ayrı ayrı uygulanarak 48 saat inkübe edildi ve MTT test yapıldı. Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6'da kombine ilaç dozlarına karşılık % canlılık değerleri görülmektedir. Kombine ilaç uygulamasının U266 hücre hattında neden olduğu % canlılık değerleri Şekil 4.14'de gösterilmiştir. Şekil 4.15'de RPMI hücreleri için kombine ilaç dozlarının neden olduğu % canlılık değerleri görülmektedir.

Çizelge 4.5. İnsan U-266 hücre hatlarının bortezomib+brivudinin farklı dozlarının kombine olarak uygulanması ve inhibisyon değerleri.

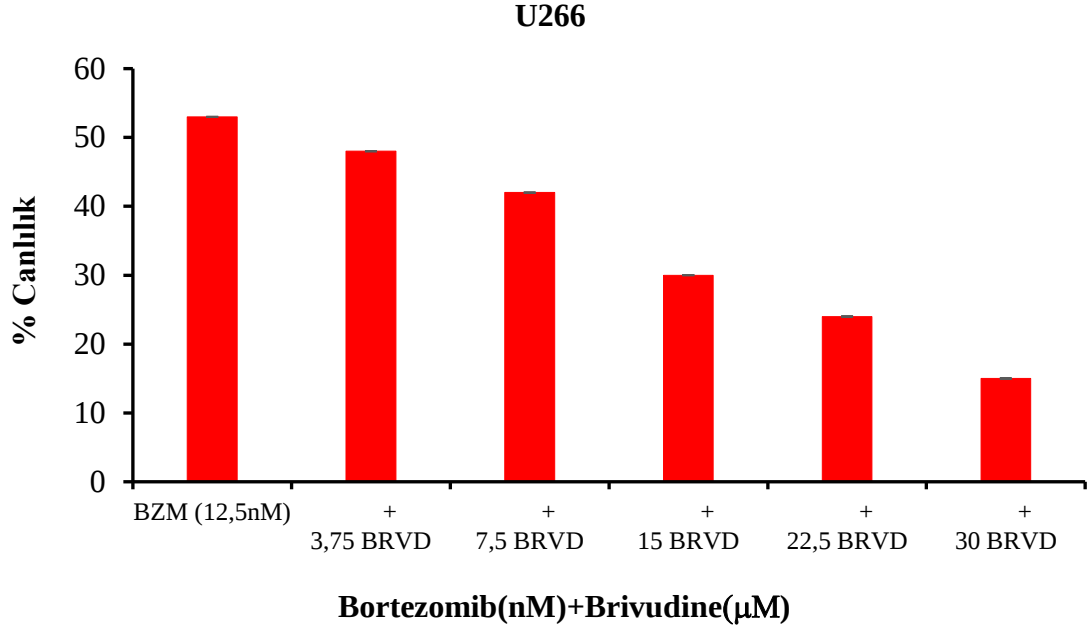
U266 Hücresi İlaç Kobinasyonları	%İnhibisyon	Kombinasyon İndeksi CI
IC50 BZM	47	
IC50 BZM + 3,75µM BRVD	51,4	additif (CI $\geq$ 1) (CI=1,060)
IC50 BZM + 7,5 µM BRVD	57,4	sinerjistik(CI< 1) (CI= 0,787)
IC50 BZM + 15 µM BRVD	69,3	sinerjistik(CI< 1) (CI=0,449)
IC50 BZM + 22,5 µM BRVD	75,1	sinerjistik(CI< 1) (CI=0,371)
IC50 BZM + 30 µM BRVD	84,1	sinerjistik(CI< 1) (CI=0,181)

Çizelge 4.6. İnsan RPMI-8226 hücre hatlarının bortezomib+brivudinin farklı dozlarının kombine olarak uygulanması ve inhibisyon değerleri.

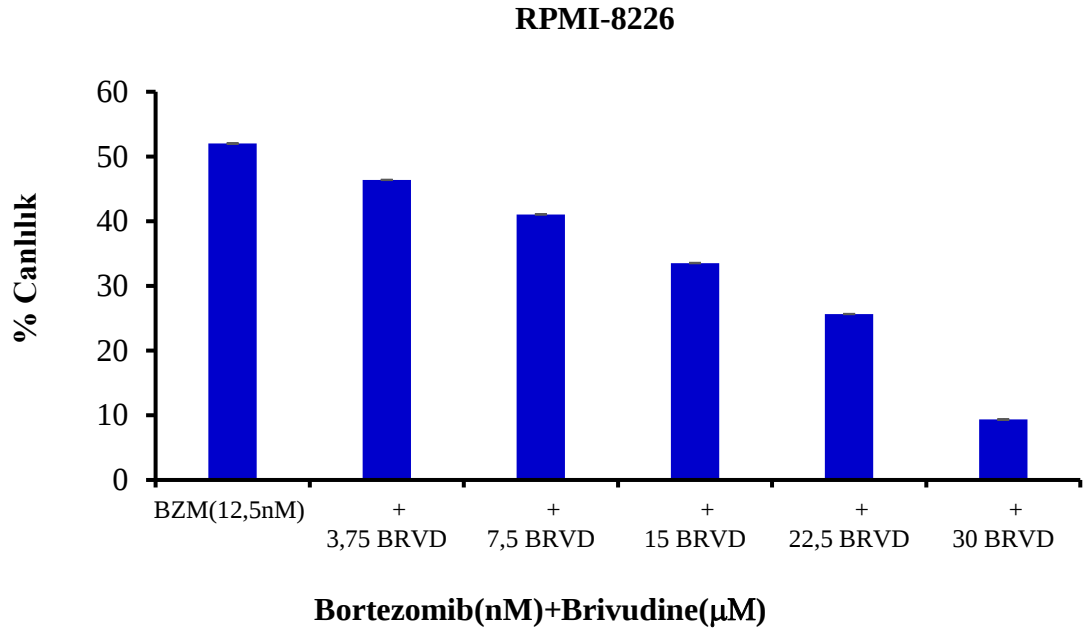
RPMI-8226 Hücresi İlaç Kobinasyonları	%İnhibisyon	Kombinasyon İndeksi CI
IC50 BZM	48	
IC50 BZM + 3,75 µM BRVD	54	additif (CI $\geq$ 1) (CI=1,112)
IC50 BZM + 7,5 µM BRVD	59	sinerjistik (CI< 1) (CI= 0,721)
IC50 BZM + 15 µM BRVD	67	sinerjistik (CI< 1) (CI=0,681)
IC50 BZM + 22,5 µM BRVD	75	sinerjistik (CI< 1) (CI=0,435)
IC50 BZM + 30 µM BRVD	91	sinerjistik (CI< 1) (CI=0,101)

Her ilacın tek başına neden olduğu % canlılık değerlerini ve kombine çalışıldığına neden olduğu % canlılık verilerini kullanarak kombinasyon indeks değerleri $CI = C_{Ax}/IC_{xA} + C_{Bx}/IC_{xB}$ eşitliği kullanılarak hesaplandı (Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6). CI değerinin 1'den küçük olması, 1'e eşit olması ve 1'den büyük olması, sırasıyla sinerjistik, additif ve antagonistik etkiyi göstermektedir. Yapılan kombine ilaç uygulamaları sonucunda her iki hücre hattı için Brivudin konsantrasyonu arttıkça % canlılık değerlerinin azaldığı görüldü. U266 hücre hattında bortezomib + 3.75 µM birivudin dozunda CI değeri 1.060 olarak bulunduğu için additif etki gözlemlendi. Ancak birivudin dozu arttıkça sinerjistik etkinin de arttığı görüldü. RPMI hücre hattında da

benzer bir etki saptanarak bortezomib + 3.75 μ M brivudinin dozunda additif etki gözlenirken (CI = 1.112), brivudin dozuna bağılı olarak sinerjistik etkinin de arttığı saptandı (Çizelge 4.5- 4.6).



Şekil 4.14. U-266 hücresi BZM ve BRVD kombine ilaç uygulanması grafiği.



Şekil 4.15. RPMI-8226 hücresi BZM ve BRVD kombine ilaç uygulanması grafiği.

4.6 HSP 27 gen ifade düzeyinin saptanması

Gen ifade düzeylerinin saptanması için sırasıyla, ilaç uygulanmış hücre hatlarından total RNA izolasyonu yapıldı, izole edilen RNA'lar dan cDNA sentezi yapıldı. cDNA'lar real time qPCR'da gene özgü primerler ve SYBR Green boyası kullanılarak amplifiye edildi. Amplikasyon ürünleri SYBR Green boyasının yaptığı flüoresan ışıma sayesinde real time olarak saptandı ve endogen gen β -aktine oranlanarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak kantitatif kantitasyon yapıldı. Amplifikasyon ürünlerinin doğruluğu için melting curve analizi yapıldı. Bu basamakların her birisi için elde edilen datalar sırasıyla aşağıda verildi.

4.6.1 Total RNA izolasyonu

U-266 ve RPMI-8226 hücrelerine 48 saatlik bortezomib ve brivudininin tekli ve kombine uygulanmasının ardından Spin kolon yöntemi ile RNA izolasyon kiti (Fermentase) kullanılarak, kitin önerdiği şekilde RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen RNA'ların konsantrasyonu 260 nm dalga boyunda okuma yapılarak, saflığı ise 260/280 nm dalga boyunda nandropia okuma yapılarak gerçekleştirildi. (Çizelge 4.7 ve 4-8). İdeal bir RNA izolasyonu için 260/280 oranının 1,8-2,0 arasında olması beklenmektedir.

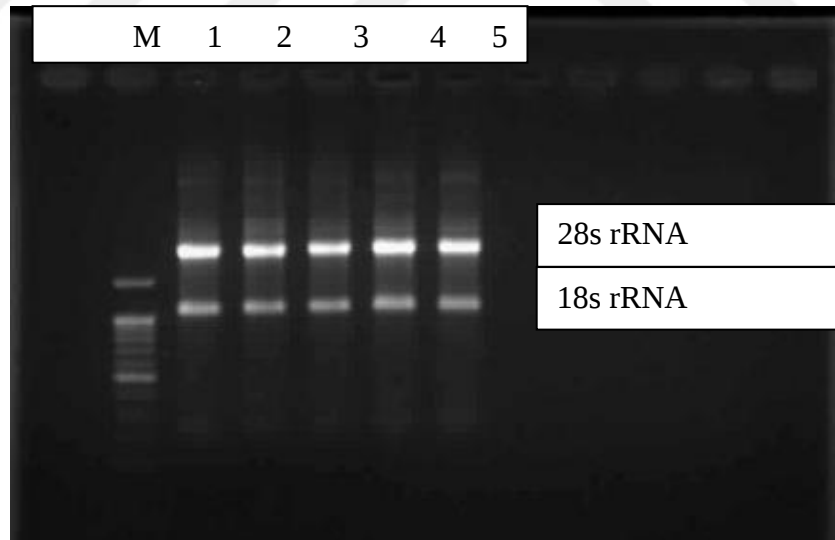
Çizelge 4.7. U266 hücrelerinden izole edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı.

U-266	Nükleik asit ng/ul	A260/A280
U266 Kontrol	1012,5	1,84
IC50 BZM	580,8	1,83
6,50 nM BZM	207,3	1,80
30 μ M BRVD	750,7	1,92
15 μ M BRVD	740,3	1,96

Çizelge 4.8. RPMI-8226 hücrelerinden izole edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı.

RPMI	Nükleik asit ng/ul	A260/A280
RPMI Kontrol	536,8	1,98
IC50 BZM	263,7	1,90
6,50 nM BZM	101,7	1,88
30 µM BRVD	336,2	1,92
15 µM BRVD	180,2	1,84

İzole edilip konsantrasyonu saptanan RNA'ların ardından izolasyonu doğrulamak için %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. EtBr ile boyanmış RNA bantları jel görüntüleme cihazında görüntülendi (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. İzole edilen RNA'ların agaroz jel görüntüsü. **M:** Marker ,**1:** U266 Kontrol, **2:** U266 12,5nM BZM, **3:** U266 30µM BRVD, **4:** RPMI Kontrol, **5:** RPMI 12,5nM BZM

4.6.2 cDNA sentez sonuçları

cDNA sentez reaksiyonu için tüm izole edilen RNA'lerden 1 µg/ml kullanıldı. Bunun için öncelikle izole edilen total RNA'lar konsantrasyonu her birisi belirli miktarlarda sulandırılarak reaksiyon ortamına eklendi. Böylelikle tüm RNA ların konsantrasyonu eşitlenmiş oldu. cDNA sentez reaksiyonu sonrası elde edilen ürünlerin konsantrasyonu tekrar nanodropta okunarak konsantrasyonları saptandı. Aşağıda her iki hücre hattı için sentezlenen cDNA örneklerine ait konsantrasyonları verilmiştir (Çizelge 4.9- Çizelge 4.10).

Çizelge 4.9. U266 hücrelerinden sentezlenen cDNA'ların konsantrasyonu ve saflığı.

U-266	Nükleik asit ng/ul	A260/A280
U266 Kontrol	796,3	1,74
IC50 BZM	861,9	1,73
6,25 nM BZM	822,5	1,73
30 µM BRVD	812,5	1,74
15 µM BRVD	813,3	1,73

Çizelge 4.10. RPMI-8226 hücrelerinden sentezlenen cDNA'ların konsantrasyonu ve saflığı.

RPMI-8226	Nükleik asit ng/ul	A260/A280
RPMI-8226 Kontrol	828,0	1,74
IC50 BZM	870,5	1,74
6,25 nM BZM	834,6	1,75
30 µM BRVD	833,8	1,76
15 µM BRVD	857,5	1,75

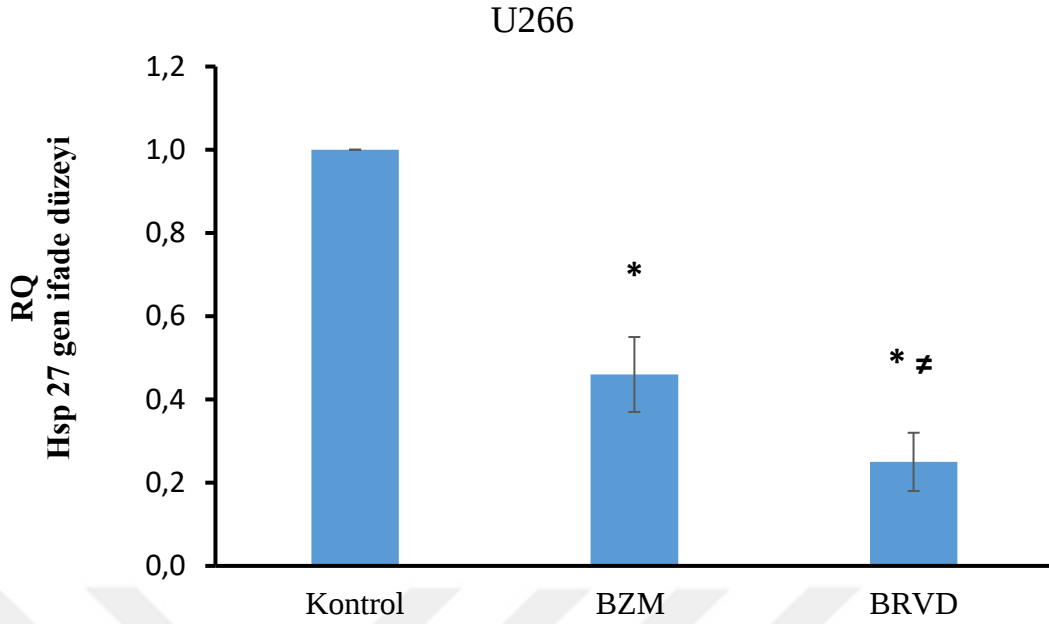
4.6.3 Real time qPCR sonuçları

Bortezomib ve brivudin uygulamasının U-266 ve RPMI-8226 hücrelerinde HSP27 gen ifade düzeyine etkisini çalışmak için SYBR Green yöntemi kullanıldı. Gen ifade düzeyleri ABI 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystem) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Endojen kontrol olarak β -actin kullanıldı. 20 µL reaksiyon ortamına

primer konsantrasyonu ve cDNA konsantrasyonu değiştirilerek optimizasyon çalışmaları yapıldı. Reaksiyon oratımına 80 ng cDNA ve 0.25 µM primer seti eklendiğinde ideal ışımlar elde edildi. Farklı zaman aralıklarında yapılan 3 ayrı deney ve her deneyde 3 tekrar olacak şekilde örnekler çalışıldı. Örnekler hiç ilaç uygulamamış kontrol grubu, ilaç uygulanmış test grubu ve kalıp içermeyen negatif kontrol (NTC) grubu olacak şekilde çalışıldı. Her genin kontrol grubuna göre gen ifade düzeyindeki katlık değişim (Relative kantitasyon (RQ)) $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri hesaplanmıştır.

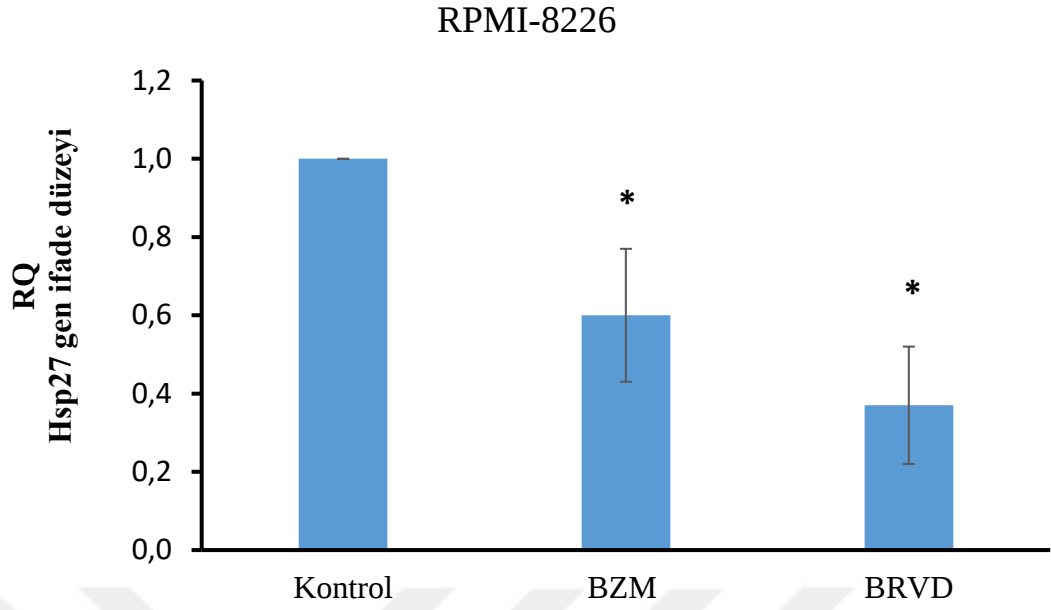
Gen ifade düzeylerini çalışmadan önce primer dimer oluşumunu önlemek için optimizasyon çalışmaları yapıldı. Amplifikasyon ürünleri 60°C'den 90°C'ye kadar ısıtılarak erime eğrileri çıkarıldı. β-aktin için eğrime eğrisi analizi sonrası Tm sıcaklığı 76-78°C, HSP27 için erime eğrisi analizi Tm sıcaklığı 87°C dir.

Şekil 4. 17'de Bortezomib ve Brivudin uygulamasının U226 hücre hatında Hsp27 mRNA düzeyine etkisi görülmektedir. Bortezomib (12,5nM) uygulaması U266 hücrelerinde Hsp27 düzeyinde $0,46 \pm 0,09$ katlık bir azalmaya neden oldu. Kontrol göre bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Brivudin (30µM) uygulaması U266 hücrelerinde $0.25 \pm 0,07$ katlık bir azalmaya neden oldu. Bu azalma da kontrol grubuna göre anlamlı bulundu ($p<0.05$). Ayrıca brivudin uygulamasının neden olduğu HSP27 gen ifade düzeyindeki azalma bortezomib uygulamasına göre de istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).



Şekil 4.17. Bortezomib ve Brivudin uygulamasının U266 hücre hattında HSP27 mRNA düzeyine etkisi. Bortezomib kontrole göre anlamlı bir düşüşe neden oldu (* $p < 0.05$). Brivudin uygulaması Bortezomibe göre anlamlı bir düşüşe neden oldu ($\neq p < 0.05$).

Şekil 4.18’de Bortezomib ve Brivudin uygulamasının RPMI-8226 hücre hatında HSP27 mRNA düzeyine etkisi görülmektedir. Bortezomib (12,5nM) uygulaması RPMI-8226 hücrelerinde HSP27 düzeyinde $0,60 \pm 0,17$ katlık bir azalmaya neden oldu. Kontrol göre bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). Brivudin (30 μ M) uygulaması RPMI-8226 hücrelerinde $0.37 \pm 0,15$ katlık bir azalmaya neden oldu. Bu azalma da kontrol grubuna göre anlamlı bulundu ($p < 0.05$). U266 hücrelerinin aksine RPMI-8226 hücrelerinde brivudin uygulamasının neden olduğu HSP27 gen ifade düzeyindeki azalma bortezomib uygulamasına göre de istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p < 0.16$).



Şekil 4.18. Bortezomib ve Brivudin uygulamasının RPMI-8226 hücre hatında HSP27 mRNA düzeyine etkisi. Bortezomib ve Brivudin uygulaması kontrole göre anlamlı bir düşüşe neden oldu (* $p<0.05$).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

MM hücrelerinde, kanserleşmeye neden olan genetik değişikler aynı zamanda hücre içerisinde hatalı ve fonksiyonel olmayan monoklonal immunoglobulinin aşırı derecede üretilmesine ve hücre içinde birikmesine neden olur [1-2]. Bu durumun neden olduğu proteotoksik strese rağmen MM hücrelerinin bölünmeye devam ederek hayatta kalmasında, hatalı proteinlerin yıkılmasını sağlayan yıkım yolları MM hücreleri için oldukça elzemdir. Bu bilgi, MM tedavisinde ilk ilerleme basamağını oluşturmuştur.

Hücredeki hatalı proteinlerin yıkımında proteasomlar, katlanmamış protein yıkım cevabı (UPR ve ERAD) ve otofaji gibi birkaç mekanizma vardır [49-50]. MM hücreleriyle yapılan ilk çalışmalarda proteasome yolağının normal hücrelere ve diğer kanser türlerine göre oldukça aktif çalıştığı saptanmıştır. Bu bilgiler proteasome inhibitörlerinin MM tedavisinde kullanılabilirliğini sağlamıştır. Bortezomib, MM tedavisinde kullanımı onaylanan ilk proteasome inhibitörüdür. Gerçektende bortezomibin antikanser etkisi birçok kanser türünde pozitif bulunmuş, özellikle hematolojik kanserlerde etkili bir apoptotik uyarıcı olduğu saptanmış, ancak en etkin antikanser etkiyi MM hücrelerinde göstermiştir [1].

Bortezomib MM tedavisinde hasta sağ kalımlarını artırdığı için büyük ilerlemelere neden olmuştur. Ancak MM hastalarının çoğunda bortezomibe karşı direnç gelişmesinden dolayı hastalık tekrarlayan şekilde nüks etmektedir. Bu durum MM tedavisini bazı hastalarda neredeyse imkânsız hale getirir. Bortezomibe karşı gelişen direncin üstesinden gelmek için ya yeni tedavi seçenekleri oluşturulmalı ya da mevcut kemoterapötiklerle farklı ilaçların bir arada kullanıldığı kombine ilaç tedavisine gidilmelidir [3,4].

Sunulan bu tez çalışmasında bortezomibin HSP27 inhibitörü olan brivudinin ile birlikte MM hücre hatlarında kullanılabilirliği araştırılmıştır. Biz bortezomibin U266 ve RPMI-8226 myeloma hücre hatlarında doza bağlı olarak artan inhibisyona neden olduğunu göstererek 48 saatlik IC50 değerlerini U266 hücrelerinde 13,75 nM, RPMI-8226 hücrelerinde ise 11,22 nM olarak bulduk. Bu IC50 değerleri, daha önce bortezomibin myeloma hücre hatlarına uygulanması ile elde edilen değerlere uygun olduğu için bizim sonuçlarımızı destekler niteliktedir [68,108]. Buna ek olarak biz brivudinin de U266 ve RPMI-8226 myeloma hücre hatlarında doza bağlı olarak artan

inhibisyona neden olduğunu göstererek 48 saatlik IC50 değerlerini U266 hücrelerinde 24,39 μ M, RPMI-8226 hücrelerinde ise 18,83 μ M olarak bulduk. Bu değerler brivudinin ile yapılan daha önceki çalışmalarda bulunan değerlere uygun olup bizim sonuçlarımızı destekler niteliktedir [19, 109].

Ayrıca bortezomib ve brivudini eş zamanlı uyguladığımız kombine ilaç uygulamalarında, brivudinin bortezomibin apoptotik etkisi üzerine doza bağlı olarak artan sinerjistik etkiye neden olduğunu bulduk. Bizim sonuçlarımızı destekler şekilde daha önce yapılan birkaç çalışmada, brivudinin kemoterapiye dirençli pankreas, sarkoma ve leukemia kanser hücrelerinde geleneksel kemoterapötik ilaçların antikanser etkisini artırdığı gösterilmiş [19,105-110]. Ayrıca ileri evre pankreas kanseri hastalara gemcitabine ile brivudinin kombine olarak kullanıldığını Faz II klinik denemelerinde hasta sağ kalımının kontrol grubuna göre 8,5 ay kadar uzadığı gösterilmiş [17,111]. Bu klinik deneme gemcitabine'nin neden olduğu yan etkiler nedeniyle durdurulmuş olsa da, brivudin için hiçbir yan etki bildirilmemiş. Bu nedenle brivudinin ikinci nesil türevlerinin geliştirilmesi üzerine çalışmalar yapılmaktadır [21].

Brivudin antikanser etkisini ısı şok proteini HSP27'yi inhibe ederek göstermektedir. [19, 64,109-112]. HSP27 multiple myeloma dahil birçok kanser türünde yüksek düzeyde ifade edilir ve bunun kemoterapötik ilaçlarla tedaviye karşı direnç gelişmesi, metastaz gelişimi ve apoptosisin önlenmesi gibi etkilere neden olduğu bilinmektedir [111,113]. HSP27 kanser terapide kullanılan ilaçlar dahil olmak üzere birçok stres koşullarına yanıt olarak ifade edilir ve tümör hücrelerinin ölümcül koşullarda hayatta kalmasına izin verir. HSP27'nin kanserin ilerlemesi üzerine çok sayıda olumsuz etkisinin olması, onu kanser tedavisi için bir hedef haline getirmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalar, brivudinin doğrudan HSP27 proteinine bağlanarak, HSP27'nin hedefi olan kaspaz 3, kaspaz 9, PI3K-AKT ve Bax gibi proteinlerle etkileşimini bozduğu için apoptosisi indüklediğini göstermiştir. Ayrıca kanser hücrelerinde HSP27 düzeyinin yüksek olması kötü prognoz, kemoterapiye duyarsızlık veya direnç gelişimiyle doğrudan ilişkili bulunmuştur [64,17,89]. HSP27 seviyesi yüksek lenfoma hücrelerinde, nispeten daha düşük olanlara göre bortezomibe karşı direnç gözlenirken, HSP27 geni knockout edildiğinde direnç ortadan kalkmış [68,112]. Bu çalışma bizim sonuçlarımızı destekler şekilde bortezomib ve HSP27

inhibisyonun kombine olarak kullanılmasının etkin bir antikanser tedavi oluşturabileceğini göstermektedir.

Biz alışmalarımızda Brivudinin hem U266 hem de RPMI-8226 myeloma hücre hatlarında HSP27 gen ifade düzeyini baskıladığını gösterdik. U266 hücrelerinde 0.25 ± 0.07 katlık, RPMI-8226 hücrelerinde ise 0.37 ± 0.15 katlık bir azalma saptadık. Bunun yanı sıra Bortezomib uygulamasının da her iki hücrede HSP27 mRNA düzeyinde 0.46 ± 0.09 ve 0.60 ± 0.17 katlık azalmaya neden olduğunu bulduk. Bizim çalışmamızı destekler nitelikte, Li ve arkadaşları [114], 2019 yılında 50 tane myeloma hastasıyla yaptıkları çalışmada, vincristine, doxorubicin ve dexamethasone (VAD) rejimi alan hasta grubuyla VAD + bortezomib rejimi alan hasta grubunun serum HSP27 düzeyleri karşılaştırılmış ve bortezomib alan grubun serum HSP27 düzeylerinin anlamlı şekilde azaldığı bulunmuş. Bu çalışmada ayrıca OGX-427 (antisense oligo-HSP27 inhibitörü) ve bortezominin U266 hücrelerinin HSP27 gen ifade düzeyinde kontrole göre anlamlı düşüşlere neden olduğu gösterilmiş. Bizim brivudin ile elde ettiğimiz değerleri Li ve arkadaşlarının [114] OGX-427 ile elde ettikleri değerlerle karşılaştırsak, brivudinin OGX-427'ye göre daha güçlü bir HSP27 inhibitörü olduğu görülebilir.

Sonuç olarak, biz brivudin ve bortezomib kombinasyon tedavisinin multiple myeloma hücre hatlarının sitotoksitesi üzerine güçlü sinerjistik etkiye neden olduğunu göstererek, myeloma tedavisinde kullanılabileceğini ve tedavinin etkinliğinde HSP27 gen ifade düzeyinin baskılanmasının rol alabileceğini önerdik.

KAYNAKLAR

1. Moreau, P., Richardson, P. G., Cavo, M., Orlowski, R. Z., San Miguel, J. F., Palumbo, A., ve Harousseau, J. L., 2012. Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later, *Blood*, 120, 5, 947–959.
2. Palumbo, A., ve Anderson, K., 2011. Multiple myeloma, *The New England journal of medicine*, 364,11, 1046–1060.
3. Niewerth, D., Jansen, G., Assaraf, Y. G., Zweegman, S., Kaspers, G. J., ve Cloos, J., 2015. Molecular basis of resistance to proteasome inhibitors in hematological malignancies, *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 18, 18–35.
4. Adams, J., Palombella, V. J., Sausville, E. A., Johnson, J., Destree, A., Lazarus, D. D., Maas, J., Pien, C. S., Prakash, S., ve Elliott, P. J., 1999. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents, *Cancer research*, 59,11, 2615–2622.
5. Craig E. A., 1993. Chaperones: helpers along the pathways to protein folding, *Science*, 260, 5116, 1902–1903
6. Zhang, L., Fok, J. H., ve Davies, F. E., 2014. Heat shock proteins in multiple myeloma, *Oncotarget*, 5, 5, 1132–1148.
7. Eugênio, A., Fook-Alves, V. L., de Oliveira, M. B., Fernando, R. C., Zanatta, D. B., Strauss, B. E., Silva, M., Porcionatto, M. A., ve Colleoni, G., 2017. Proteasome and heat shock protein 70 (HSP70) inhibitors as therapeutic alternative in multiple myeloma, *Oncotarget*, 8,70, 114698–114709.
8. Afzal, E., Ebrahimi, M., Najafi, S. M., Daryadel, A., ve Baharvand, H., 2011. Potential role of heat shock proteins in neural differentiation of murine embryonal carcinoma stem cells (P19), *Cell biology international*, 35,7, 713–720
9. Grosicki, S., Bednarczyk, M., ve Janikowska, G., 2020. Heat shock proteins as a new, promising target of multiple myeloma therapy, *Expert review of hematology*, 13,2, 117–126.
10. Jacob, P., Hirt, H., ve Bendahmane, A., 2017. The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance, *Plant biotechnology journal*, 15,4, 405–414.
11. Kim, J. Y., Kim, J. W., ve Yenari, M. A., 2020. Heat shock protein signaling in brain ischemia and injury, *Neuroscience letters*, 715, 1-16.
12. Workman, P., ve Davies, F. E., 2011. A stressful life (or death): combinatorial proteotoxic approaches to cancer-selective therapeutic vulnerability, *Oncotarget*, 2,4, 277–280.

13. Liu, J., ve Nussinov, R., 2013. The role of allostery in the ubiquitin-proteasome system, *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 48, 2, 89–97.
14. Dokladny, K., Myers, O. B., ve Moseley, P. L., 2015. Heat shock response and autophagy--cooperation and control, *Autophagy*, 11,2, 200–213.
15. Xiong, J., Li, Y., Tan, X., ve Fu, L., 2020. Small Heat Shock Proteins in Cancers: Functions and Therapeutic Potential for Cancer Therapy, *International journal of molecular sciences*, 21,18, 6611
16. Jeffery, W. R., ve Gorički, Š., 2021. Apoptosis is a generator of Wnt-dependent regeneration and homeostatic cell renewal in the ascidian *Ciona*, *Biology open*, 10,4, bio058526.
17. Heinrich, J. C., Tuukkanen, A., Schroeder, M., Fahrig, T., ve Fahrig, R., 2011. RP101 (brivudine) binds to heat shock protein HSP27 (HSPB1) and enhances survival in animals and pancreatic cancer patients, *Journal of cancer research and clinical oncology*, 137,9, 1349–1361
18. Chatterjee, S., ve Burns, T. F., 2017. Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach, *International journal of molecular sciences*, 18,9, 1978
19. Fahrig, R., Quetzsch, D., Heinrich, J. C., Heinemann, V., Boeck, S., Schmid, R. M., Praha, C., Liebert, A., Sonntag, D., Krupitza, G., ve Hänel, M., 2006. RP101 improves the efficacy of chemotherapy in pancreas carcinoma cell lines and pancreatic cancer patients, *Anti-cancer drugs*, 17,9, 1045–1056.
20. Gibert, B., Eckel, B., Gonin, V., Goldschneider, D., Fombonne, J., Deux, B., Mehlen, P., Arrigo, A. P., Clézardin, P., ve Diaz-Latoud, C., 2012. Targeting heat shock protein 27 (HspB1) interferes with bone metastasis and tumour formation in vivo, *British journal of cancer*, 107,1, 63–70.
21. Heinrich, J. C., Donakonda, S., Haupt, V. J., Lennig, P., Zhang, Y., ve Schroeder, M., 2016. New HSP27 inhibitors efficiently suppress drug resistance development in cancer cells, *Oncotarget*, 7,42, 68156–68169.
22. Brigle, K., ve Rogers, B., 2017. Pathobiology and Diagnosis of Multiple Myeloma, *Seminars in oncology nursing*, 33,3, 225–236.
23. Anderson, K. C., ve Carrasco, R. D., 2011. Pathogenesis of myeloma. *Annual review of pathology*, 6, 249–274.
24. URL-1 <https://en.wikipedia.org/wiki/Proteasome_inhibitor> Erişim Tarihi:30.05.2022
25. Michels, T. C., ve Petersen, K. E., 2017. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment, *American family physician*, 95,6, 373–383.
26. Mukkamalla, S., ve Malipeddi, D., 2021. Myeloma Bone Disease: A Comprehensive Review, *International journal of molecular sciences*, 22,12, 6208.

27. Lipchick, B. C., Fink, E. E., ve Nikiforov, M. A., 2016. Oxidative stress and proteasome inhibitors in multiple myeloma, *Pharmacological research*, 105, 210–215.
28. Rajkumar S. V., 2019. Multiple myeloma: Every year a new standard?, *Hematological oncology*, 37, 62–65.
29. Kyle, R. A., & Rajkumar, S. V., 2008. Multiple myeloma. *Blood*, 111,6, 2962–2972.
30. Kazandjian D., 2016. Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy, *Seminars in oncology*, 43, 6, 676–681.
31. Palumbo, A., ve Anderson, K., 2011. Multiple myeloma, *The New England journal of medicine*, 364,11, 1046–1060
32. Laubach, J., Richardson, P., ve Anderson, K., 2011. Multiple myeloma. *Annual review of medicine*, 62, 249–264.
33. URL1<<https://www.mdedge.com/clinicianreviews/article/154987/oncology/diagnosing-multiple-myeloma-primary-care>> Erişim tarihi: 29.05.2020
34. Nikesitch, N., ve Ling, S. C., 2016. Molecular mechanisms in multiple myeloma drug resistance. *Journal of clinical pathology*, 69,2, 97–101
35. Besse, L., Sedlarikova, L., Greslikova, H., Kupska, R., Almasi, M., Penka, M., Jelinek, T., Pour, L., Adam, Z., Kuglik, P., Krejci, M., Hajek, R., ve Sevcikova, S., 2016. Cytogenetics in multiple myeloma patients progressing into extramedullary disease, *European journal of haematology*, 97,1, 93–100.
36. Mikhael J., 2020. Treatment Options for Triple-class Refractory Multiple Myeloma, *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*, 20,1, 1–7.
37. Dutta, R., ve Mahato, R. I., 2017. Recent advances in hepatocellular carcinoma therapy, *Pharmacology & therapeutics*, 173, 106–117.
38. Rajkumar S. V., 2020. Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management, *American journal of hematology*, 95, 5, 548–567.
39. Van de Donk, N., Pawlyn, C., ve Yong, K. L., 2021. Multiple myeloma, *Lancet*, 397,10272, 410–427
40. Shah, S. P., Lonial, S., ve Boise, L. H., 2015. When Cancer Fights Back: Multiple Myeloma, Proteasome Inhibition, and the Heat-Shock Response, *Molecular cancer research: MCR*, 13,8, 1163–1173.
41. Chen, D., Frezza, M., Schmitt, S., Kanwar, J., ve Dou, Q. P., 2011. Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives, *Current cancer drug targets*, 11,3, 239–253

42. Adams J., 2004. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs, *Cancer cell*, 5, 5, 417–421.
43. Teicher, B. A., ve Tomaszewski, J. E., 2015. Proteasome inhibitors, *Biochemical pharmacology*, 96,1, 1–9
44. Yun, C. W., Kim, H. J., Lim, J. H., ve Lee, S. H., 2019. Heat Shock Proteins: Agents of Cancer Development and Therapeutic Targets in Anti-Cancer Therapy, *Cells*, 9,1, 60.
45. Liu, J., ve Nussinov, R., 2013. The role of allostery in the ubiquitin-proteasome system, *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 48, 2, 89–97.
46. Cao, B., ve Mao, X., 2011. The ubiquitin-proteasomal system is critical for multiple myeloma: implications in drug discovery, *American journal of blood research*, 1,1, 46–56.
47. Laskowska, E., Kuczyńska-Wiśnik, D., ve Lipińska, B., 2019. Proteomic analysis of protein homeostasis and aggregation, *Journal of proteomics*, 198, 98–112.
48. Yang, L., Calay, E. S., Fan, J., Arduini, A., Kunz, R. C., Gygi, S. P., Yalcin, A., Fu, S., ve Hotamisligil, G. S., 2015. METABOLISM. S-Nitrosylation links obesity-associated inflammation to endoplasmic reticulum dysfunction, *Science*, 349,6247, 500–506.
49. Lemmer, I. L., Willemsen, N., Hilal, N., ve Bartelt, A., 2021. A guide to understanding endoplasmic reticulum stress in metabolic disorders, *Molecular metabolism*, 47, 101169
50. Nikesitch, N., Lee, J. M., Ling, S., ve Roberts, T. L., 2018. Endoplasmic reticulum stress in the development of multiple myeloma and drug resistance, *Clinical & translational immunology*, 7, 1, e1007,1-13
51. Tatar M, Tatar T. 2019, Endoplazmik Retikulum Stresi ve İlişkili Hastalıklar, *Osmangazi Tıp Dergisi*, 41,3, 294-303
52. O'Malley, J., Kumar, R., Inigo, J., Yadava, N., ve Chandra, D., 2020. Mitochondrial Stress Response and Cancer, *Trends in cancer*, 6,8, 688–701.
53. Lee, W. S., Yoo, W. H., ve Chae, H. J., 2015. ER Stress and Autophagy. *Current molecular medicine*, 15,8, 735–745.
54. Hetz C., 2012. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13, 2, 89–102.
55. Read, A., ve Schröder, M., 2021. The Unfolded Protein Response: An Overview, *Biology*, 10, 5, 384.
56. Adams, C. J., Kopp, M. C., Larburu, N., Nowak, P. R., ve Ali, M., 2019. Structure and Molecular Mechanism of ER Stress Signaling by the Unfolded Protein Response Signal Activator IRE1, *Frontiers in molecular biosciences*, 6, 11.

57. Huang, J., Pan, H., Wang, J., Wang, T., Huo, X., Ma, Y., Lu, Z., Sun, B., ve Jiang, H., 2021. Unfolded protein response in colorectal cancer, *Cell & bioscience*, 11,1, 26.
58. Çetin, G., Klafack, S., Studencka-Turski, M., Krüger, E., ve Ebstein, F., 2021. The Ubiquitin-Proteasome System in Immune Cells, *Biomolecules*, 11, 1, 60.
59. Udono, H., Ichiyanagi, T., Mizukami, S., ve Imai, T., 2009. Heat shock proteins in antigen trafficking--implications on antigen presentation to T cells, *International journal of hyperthermia: the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*, 25, 8, 617–625.
60. Lanneau, D., Brunet, M., Frisan, E., Solary, E., Fontenay, M., ve Garrido, C., 2008. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation, *Journal of cellular and molecular medicine*, 12, 3, 743–761.
61. Lang, B. J., Guerrero-Giménez, M. E., Prince, T. L., Ackerman, A., Bonorino, C., ve Calderwood, S. K., 2019. Heat Shock Proteins Are Essential Components in Transformation and Tumor Progression: Cancer Cell Intrinsic Pathways and Beyond, *International journal of molecular sciences*, 20,18, 4507
62. Carpenter, R. L., ve Gökmen-Polar, Y., 2019. HSF1 as a Cancer Biomarker and Therapeutic Target, *Current cancer drug targets*, 19,7, 515–524.
63. Ciocca, D. R., Arrigo, A. P., ve Calderwood, S. K., 2013. Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update, *Archives of toxicology*, 87,1, 19–48.
64. Wu, J., Liu, T., Rios, Z., Mei, Q., Lin, X., ve Cao, S., 2017. Heat Shock Proteins and Cancer, *Trends in pharmacological sciences*, 38, 3, 226–256.
65. Mymrikov, E. V., Seit-Nebi, A. S., ve Gusev, N. B., 2011. Large potentials of small heat shock proteins, *Physiological reviews*, 91, 4, 1123–1159.
66. Tissières, A., Mitchell, H. K., ve Tracy, U. M., 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs, *Journal of molecular biology*, 84,3, 389–398.
67. Das, J.K, Xiong, X., Ren, X., Yang, J., ve Song, J., 2019. Heat Shock Proteins in Cancer Immunotherapy, *Journal of Oncology*, 2019, 1-9
68. Zuo, D., Subjeck, J., ve Wang, X. Y., 2016. Unfolding the Role of Large Heat Shock Proteins: New Insights and Therapeutic Implications, *Frontiers in immunology*, 7, 75.
69. Chakafana, G., ve Shonhai, A., 2021. The Role of Non-Canonical Hsp70s (Hsp110/Grp170) in Cancer, *Cells*, 10,2, 254.
70. Borkovich, K. A., Farrelly, F. W., Finkelstein, D. B., Taulien, J., ve Lindquist, S., 1989. hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures, *Molecular and cellular biology*, 9,9, 3919–3930.

71. Aligue, R., Akhavan-Niak, H., ve Russell, P., 1994. A role for Hsp90 in cell cycle control: Wee1 tyrosine kinase activity requires interaction with Hsp90, *The EMBO journal*, 13,24, 6099–6106
72. Stancato, L. F., Chow, Y. H., Hutchison, K. A., Perdew, G. H., Jove, R., ve Pratt, W. B., 1993. Raf exists in a native heterocomplex with hsp90 and p50 that can be reconstituted in a cell-free system, *The Journal of biological chemistry*, 268, 29, 21711–21716.
73. Birbo, B., Madu, E. E., Madu, C. O., Jain, A., ve Lu, Y., 2021. Role of HSP90 in Cancer, *International journal of molecular sciences*, 22,19, 10317.
74. Li, J., ve Buchner, J., 2013. Structure, function and regulation of the hsp90 machinery, *Biomedical journal*, 36, 3, 106–117.
75. Fernández-Fernández, M. R., ve Valpuesta, J. M., 2018. Hsp70 chaperone: a master player in protein homeostasis, *F1000Research* 2018, 7(F1000 Faculty Rev), 1497,1-10
76. Shevtsov, M., Huile, G., ve Multhoff, G., 2018. Membrane heat shock protein 70: a theranostic target for cancer therapy. *Philosophical transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological sciences*, 373,1738, 20160526
77. Duan, Y., Tang, H., Mitchell-Silbaugh, K., Fang, X., Han, Z., ve Ouyang, K., 2020. Heat Shock Protein 60 in Cardiovascular Physiology and Diseases, *Frontiers in molecular biosciences*, 30,7-73
78. Kaida, A., ve Iwakuma, T., 2021. Regulation of p53 and Cancer Signaling by Heat Shock Protein 40/J-Domain Protein Family Members, *International journal of molecular sciences*, 22, 24, 13527.
79. Choi, S. K., Kam, H., Kim, K. Y., Park, S. I., ve Lee, Y. S., 2019. Targeting Heat Shock Protein 27 in Cancer: A Druggable Target for Cancer Treatment?, *Cancers*, 11, 8, 1195.
80. Bakthisaran, R., Tangirala, R., ve Rao, C., 2015. Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology. *Biochimica et biophysica acta*, 1854,4, 291–319.
81. Acunzo, J., Andrieu, C., Baylot, V., So, A., ve Rocchi, P., 2014. Hsp27 as a therapeutic target in cancers. *Current drug targets*, 15,4, 423–431.
82. Kanagasabai, R., Karthikeyan, K., Vedam, K., Qien, W., Zhu, Q., ve Ilangovan, G., 2010. Hsp27 protects adenocarcinoma cells from UV-induced apoptosis by Akt and p21-dependent pathways of survival, *Molecular cancer research: MCR*, 8, 10, 1399–1412.
83. Zhang, B., Xie, F., Aziz, A., Shao, S., Li, W., Deng, S., Liao, X., ve Liu, B., 2019. Heat Shock Protein 27 Phosphorylation Regulates Tumor Cell Migration under Shear Stress, *Biomolecules*, 9,2, 50.

84. Singh, M.K., Sharma, B., Tiwari, P. K., 2019. The small heat shock protein Hsp27: Present understanding and future prospects, *Journal of Thermal Biology*, 69, 149-154
85. Lampros, M., Vlachos, N., Voulgaris, S., ve Alexiou, G. A., 2022. The Role of Hsp27 in Chemotherapy Resistance, *Biomedicines*, 10, 4, 897.
86. Zheng, S., Liang, Y., Li, L., Tan, Y., Liu, Q., Liu, T., ve Lu, X., 2022. Revisiting the Old Data of Heat Shock Protein 27 Expression in Squamous Cell Carcinoma: Enigmatic HSP27, *More Than Heat Shock, Cells*, 11,10, 1665.
87. Grosicki, S., Bednarczyk, M., ve Janikowska, G., 2020. Heat shock proteins as a new, promising target of multiple myeloma therapy, *Expert review of hematology*, 13,2, 117–126.
88. Holguin, B. A., Hildenbrand, Z. L., ve Bernal, R. A., 2022. Insights Into the Role of Heat Shock Protein 27 in the Development of Neurodegeneration, *Frontiers in molecular neuroscience*, 15, 868089.
89. Arrigo, A. P., ve Gibert, B., 2012. HspB1 dynamic phospho-oligomeric structure dependent interactome as cancer therapeutic target, *Current molecular medicine*, 12,9, 1151–1163.
90. Ikwegbue, P. C., Masamba, P., Mbatha, L. S., Oyinloye, B. E., ve Kappo, A. P., 2019. Interplay between heat shock proteins, inflammation and cancer: a potential cancer therapeutic target, *American journal of cancer research*, 9, 2, 242–249.
91. Paul, C., Manero, F., Gonin, S., Kretz-Remy, C., Viot, S., ve Arrigo, A. P., 2002. Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release, *Molecular and cellular biology*, 22,3, 816–834.
92. Havasi, A., Li, Z., Wang, Z., Martin, J. L., Botla, V., Ruchalski, K., Schwartz, J. H., ve Borkan, S. C., 2008. Hsp27 inhibits Bax activation and apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism, *The Journal of biological chemistry*, 283, 18, 12305–12313.
93. Arya, R., Mallik, M., ve Lakhotia, S. C., 2007. Heat shock genes- integrating cell survival and death, *Journal of biosciences*, 32,3, 595–610.
94. Sun, X., Siri, S., Hurst, A., ve Qiu, H., 2021. Heat Shock Protein 22 in Physiological and Pathological Hearts: Small Molecule, Large Potentials. *Cells*, 11,1, 114
95. Porta, C., Paglino, C., ve Mosca, A., 2014. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer, *Frontiers in oncology*, 4, 64.
96. Deng, W., Zhang, Y., Gu, L., Cui, J., Duan, B., Wang, Y., ve Du, J., 2016. Heat shock protein 27 downstream of P38-PI3K/Akt signaling antagonizes melatonin-induced apoptosis of SGC-7901 gastric cancer cells, *Cancer cell international*, 16, 5.

97. Yun, C. W., Kim, H. J., Lim, J. H., ve Lee, S. H., 2019. Heat Shock Proteins: Agents of Cancer Development and Therapeutic Targets in Anti-Cancer Therapy, *Cells*, 9,1, 60.
98. Lutsch, G., Vetter, R., Offhauss, U., Wieske, M., Gröne, H. J., Klemenz, R., Schimke, I., Stahl, J., ve Benndorf, R., 1997. Abundance and location of the small heat shock proteins HSP25 and alphaB-crystallin in rat and human heart, *Circulation*, 96,10, 3466–3476.
99. Luigetti, M., Fabrizi, G. M., Madia, F., Ferrarini, M., Conte, A., Del Grande, A., Tasca, G., Tonali, P. A., ve Sabatelli, M., 2010. A novel HSPB1 mutation in an Italian patient with CMT2/dHMN phenotype, *Journal of the neurological sciences*, 298,2, 114–117.
100. De Clercq E., 2004. Discovery and development of BVDU (brivudin) as a therapeutic for the treatment of herpes zoster, *Biochemical pharmacology*, 68, 12, 2301–2315
101. Tompa, D. R., Immanuel, A., Srikanth, S., ve Kadhirvel, S., 2021. Trends and strategies to combat viral infections: A review on FDA approved antiviral drugs. *International journal of biological macromolecules*, 172, 524–541
102. URL-2<https://www.researchgate.net/figure/Conversion-of-MTT-to-formazan-by-NADH-dependent-reductases_fig36_265025671>Erişimtarihi: 01.03.2022
103. Zhao, L., Wientjes, M. G., & Au, J. L., 2004. Evaluation of combination chemotherapy: integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and combination index analyses, *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10, 23, 7994–8004.
104. Zhao, L., Au, J. L., ve Wientjes, M. G., 2010. Comparison of methods for evaluating drug-drug interaction, *Frontiers in bioscience*, 2, 1, 241–249.
105. Rodríguez-Lázaro, D., Herna´ndez, M., 2014. Identification Methods | Real-Time PCR, *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2, 344-350.
106. Livak, K. J., ve Schmittgen, T. D., 2001 Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the $2^{\Delta\Delta CT}$ Method, *Methods*, 25, 402–408.
107. Wong, M. L., ve Medrano, J. F., 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation, *BioTechniques*, 39,1, 75–85.
108. Chauhan, D., Singh, A., Brahmandam, M., Podar, K., Hideshima, T., Richardson, P., Munshi, N., Palladino, M. A., ve Anderson, K. C., 2008. Combination of proteasome inhibitors bortezomib and NPI-0052 trigger in vivo synergistic cytotoxicity in multiple myeloma, *Blood*, 111,3, 1654–1664.
109. Fahrig, R., Heinrich, J. C., Nickel, B., Wilfert, F., Leisser, C., Krupitza, G., Praha, C., Sonntag, D., Fiedler, B., Scherthan, H., ve Ernst, H., 2003. Inhibition of induced chemoresistance by cotreatment with (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (RP101), *Cancer research*, 63,18, 5745–5753

110. Nakashima, M., Adachi, S., Yasuda, I., Yamauchi, T., Kawaguchi, J., Itani, M., Yoshioka, T., Matsushima-Nishiwaki, R., Hirose, Y., Kozawa, O., ve Moriwaki, H., 2011. Phosphorylation status of heat shock protein 27 plays a key role in gemcitabine-induced apoptosis of pancreatic cancer cells, *Cancer letters*, 313, 2, 218–225.
111. Okuno, M., Adachi, S., Kozawa, O., Shimizu, M., ve Yasuda, I., 2016. The Clinical Significance of Phosphorylated Heat Shock Protein 27 (HSPB1) in Pancreatic Cancer, *International journal of molecular sciences*, 17,1, 137
112. Schmitt, E., Gehrman, M., Brunet, M., Multhoff, G., ve Garrido, C., 2007. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy, *Journal of leukocyte biology*, 81,1, 15–27.
113. Mori-Iwamoto, S., Kuramitsu, Y., Ryoza, S., Mikuria, K., Fujimoto, M., Maehara, S., Maehara, Y., Okita, K., Nakamura, K., ve Sakaida, I., 2007. Proteomics finding heat shock protein 27 as a biomarker for resistance of pancreatic cancer cells to gemcitabine, *International journal of oncology*, 31,6, 1345–1350.
114. Li, J., Zhang, X., Shen, J., Guo, J., Wang, X., ve Liu, J., 2019. Bortezomib promotes apoptosis of multiple myeloma cells by regulating HSP27, *Molecular Medicine Reports*, 20, 2410-2418.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Ayşegül TETİK

EĞİTİM BİLGİLERİ

Lisans : Ankara Üniversitesi, Hemşirelik Bölümü, 2012-2016

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi Biyoloji A.B.D., 2017-2022

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

1. Ankara İbni Sina Hastanesi / Dönem Stajı

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Kongrelerde Sunulan Makaleler

1. Ayşegül TETİK ve Kamile ÖZTÜRK, 2022. The Combination of HSP27 Inhibitor Brivudine with Bortezomib Exhibits Synergistic Effect on Cytotoxicity of Multiple Myeloma Cell Lines. 7. Uluslararası 19 Mayıs Yenilikçi Bilimsel Yaklaşımlar Kongresi, 19-20 Mayıs 2022, Samsun, Türkiye