



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

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MULTİPLE MYELOMA KANSER HÜCRELERİNDE
BORTEZOMİBE KARŞI OLUŞAN ÇOKLU İLAÇ DİRENÇ
MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Gül KOZALAK

DANIŞMAN

Doç. Dr. Emine ÖKSÜZOĞLU

AKSARAY, 2019

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 132325605 numaralı Doktora öğrencisi, Gül KOZALAK tarafından hazırlanan "**MULTİPLE MYELOMA KANSER HÜCRELERİNDE BORTEZOMİBE KARŞI OLUŞAN ÇOKLU İLAÇ DİRENÇ MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir

Danışman: Doç. Dr. Emine ÖKSÜZOĞLU

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.



Üye: Prof. Dr. Nuran DİRİL

Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.



Üye: Prof. Dr. Sibel SÜMER

Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.



Üye: Prof. Dr. Kamile ÖZTÜRK

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.



Üye: Doç. Dr. Mehmet KARACA

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.



Tez Savunma Tarihi: 10/01/2019

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

Doç. Dr. Mehmet Ali HINIS

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOĞRULUK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduđum bu çalıřmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı dűőecek bir yol ve yardıma bařvurmaksızın yazdıđımı, yararlandıđım eserlerin kaynakçada gűsterilenlerden oluřtuđunu, çalıřmamda kullandıđım verilerin orijinallięini ve her tűrlű intihalden uzak olduđunu beyan ederim.

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



Gűl KOZALAK

TEŞEKKÜR

İlk aşı ve antibiyotiğin bulunmasıyla başlayan bir süreçle insanoğlu hastalıklarla nasıl başa çıkabileceğini gün geçtikçe daha iyi öğrenmektedir. ‘Çağın hastalığı’ olarak nitelendirdiğimiz, aslında var oluşumuzdan beri genlerimizle taşıyarak aktardığımız bir hastalık olan kanser de bugün çok çeşitli ajanlarla tedavi edilebilmektedir. Ne yazık ki birçok hastalığın ve kanserin tedavisi sırasında yeni bir fenomen ortaya çıkmıştır ‘Çoklu İlaç Dirençliliği’. Bu durum uzun çabalar sonucu keşfedilen ilaçların hastalar üzerinde beklenen etkisini göstermesine engel olmaktadır. Çoklu ilaç dirençliliğinin sebebi olarak şimdiye kadar çeşitli faktör ve mekanizmalar tanımlanmıştır. Maalesef ki bu mekanizmaların hiç biri tümüyle bu fenomenin sebebini açıklamakta ve ortadan kaldırılmasını sağlamakta yetersiz kalmıştır. Birçok bilim insanıyla birlikte benim de bu konu ilgimi çektiğinden bu durumun aydınlatılabilmesi için tez konumu Multiple myeloma hücre hatlarında Bortezomib dirençliliğinin araştırılması konusunda seçtim. Umarım yaptığım bu çalışma ile bu fenomenin altında yatan sebeplerin daha iyi anlaşılmasını sağlayabilir ve tamamen ortadan kaldırılmasında bir taş da ben yerinden oynatabilirim.

Doktora eğitimim boyunca beni eğiten, yönlendiren, yüreklendiren danışmanım, değerli hocam, saygıdeğer **Doç. Dr. Emine ÖKSÜZOĞLU**’na en içten duygularıyla teşekkür ediyorum. Her zaman zihnimde yeni bir ışık yakan, hep yanımda olduğunu bildiğim, fikirleriyle etrafını aydınlatan, değerli hocam **Prof. Dr. Kamile ÖZTÜRK**’e teşekkürlerimi sunuyorum. Deneylerin gerçekleşmesinde her sıkıştığımda yardımına koşan, arkadaşım **Mehtap TARHAN**’a çok teşekkür ediyorum. Bu süreçte fikir paylaşımında bulunduğum, arkadaşım **Nazende ATÇEKEN**’e çok teşekkür ediyorum. Her düştüğümde beni kaldıran, hep ileriye bakmamı sağlayan, fikirleriyle ve varlığıyla bana destek olan, yoldaşım **Burak Kadir DURAK**’a en kalbi duygularıyla teşekkür ediyorum. Bugünlere gelmemdeki emeği, desteği ve genetiği benden esirgemeyen, sevgili annem **Nur DEYNEK**’in ellerinden minnet ve teşekkürle öpüyorum. Şu ana kadar gerek maddi gerek manevi her türlü zorluğun üstesinden birlikte geldiğimiz ve bundan sonrasında geleceğimiz, biricik ablam **Hatice KOZALAK**’a çok teşekkür ediyorum. Bilgisayarla ilgili işlemlerin çözülmesinde mesai harcayan, hem bana sabrından hem de güler yüzünü hiç esirgemediğinden, canım kardeşim **Fatih Murat KOZALAK**’a çok teşekkür ediyorum.

Tezimin gerçekleşmesinde **2015-073** numaralı Doktora BAP Projesiyle maddi destek sağlayan **Aksaray Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi**’ne teşekkür ediyorum.

Gül KOZALAK

AKSARAY, 2019

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. Kanser	3
2.2. Multiple Myeloma	6
2.2.1. MM Sitogenetiği	11
2.2.2. MM Evrenlenmesi	12
2.2.3. MM Tedavisi	13
2.3. Ubikitin-Proteozom Sistemi (UPS)	14
2.3.1. Proteozom İnhibitörleri	19
2.3.1.1. Bortezomib	22
2.4. Kanserde İlaç Dirençliliği	25
2.4.1. Anormal İlaç Taşınımı	29
2.4.1.1. ABC Taşıyıcıları	31
2.4.1.2. ABC Taşıyıcılarıyla İlgili Direnci Geri Çevirme	54
2.4.2. İlaç Metabolizmasındaki Değişiklikler	55
2.4.2.1. Glutasyon S-Transferaz	58
2.4.3. Hücre Siklusu Düzenlenmesindeki Değişiklikler	61
2.4.4. Apoptosis Mekanizmasındaki Değişiklikler	62
2.4.5. Sinyal Yolaklarındaki Değişiklikler	64
2.4.5.1. NF-KB Aktivitesi	64
2.4.5.2. Kemik İliği Mikroçevresinin Rolü	67
2.4.6. Sitogenetik ve Epigenetik Değişiklikler	69
2.4.7. İlaç Hedeflerindeki Değişiklikler	70
2.4.7.1. Proteozomun $\beta 5$ Altünitesindeki Nokta Mutasyonları	70
2.4.7.2. Proteozomun $\beta 5i$ Altünitesindeki Nokta Mutasyonları	72
2.4.7.3. Proteozom Altünitelerinin İfadesindeki Değişimler	72
3. MALZEME ve YÖNTEM	74
3.1. Hücre Kültürü	74
3.1.1. Hücre Kültürünün Yapılışı	74
3.1.2. Hücrelerin Pasajlanması	74
3.1.3. Hücre Sayılarının Hesaplanması	76
3.1.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması	76
3.2. Hücre Proliferasyon Analizi	77

3.2.1. Bortezomib Dozunun Belirlenmesi	77
3.2.2. MTT Testi	77
3.2.3. IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi	79
3.3. RNA İzolasyonu.....	80
3.3.1. RNA İzolasyonu İçin Hücre Ekimi	80
3.3.2. RNA İzolasyonunun Yapılışı	81
3.3.3. Nanodrop Ölçümü.....	81
3.3.4. Agaroz Jel Elektforezi	82
3.4. cDNA Sentezi.....	82
3.5. Gen İfade Analizi	83
3.5.1. Realtime Multipleks PCR.....	83
3.5.2. Realtime PCR Ürünlerindeki Katlık Değişimin Hesaplanması	85
3.5.3. İstatistiksel Analiz.....	85
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	86
4.1. MTT Analizi Sonuçları	86
4.1.1. IC ₅₀ Değerleri	87
4.1.2. Dirençlilik İndislerinin Hesaplanması	87
4.2. RNA İzolasyonu Sonuçları	88
4.3. cDNA Sentezi Sonuçları	90
4.4. Gen İfade Analizi	90
4.4.1. Hücre Hatlarının 24 Saat İçerisinde Bortezomib Doz Artışına Bağlı Olarak Gen İfade Analizleri	91
4.4.1.1. P-gp Geninin İfade Sonuçları	91
4.4.1.2. MRP-1 Geninin İfade Sonuçları	92
4.4.1.3. MRP-2 Geninin İfade Sonuçları	94
4.4.1.4. MRP-3 Geninin İfade Sonuçları	96
4.4.1.5. MRP-6 Geninin İfade Sonuçları	96
4.4.1.6. MRP-7 Geninin İfade Sonuçları	98
4.4.1.7. GSTP1 Geninin İfade Sonuçları	100
4.4.2. Hücre Hatlarının 48 Saat İçerisinde Bortezomib Doz Artışına Bağlı Olarak Gen İfade Analizleri	102
4.4.2.1. P-gp Geninin İfade Sonuçları	102
4.4.2.2. MRP-1 Geninin İfade Sonuçları	104
4.4.2.3. MRP-2 Geninin İfade Sonuçları	106
4.4.2.4. MRP-3 Geninin İfade Sonuçları	108
4.4.2.5. MRP-6 Geninin İfade Sonuçları	108
4.4.2.6. MRP-7 Geninin İfade Sonuçları	110
4.4.2.7. GSTP1 Geninin İfade Sonuçları	112
4.4.3. Hücre Hatlarının Sabit Bortezomib Dozlarında 24 ve 48 Saat Sürelerdeki Gen İfade Analizleri.....	114
4.4.3.1. P-gp Geninin İfade Sonuçları	114
4.4.3.2. MRP-1 Geninin İfade Sonuçları	116
4.4.3.3. MRP-2 Geninin İfade Sonuçları	118
4.4.3.4. MRP-3 Geninin İfade Sonuçları	120
4.4.3.5. MRP-6 Geninin İfade Sonuçları	120

4.4.3.6. MRP-7 Geninin İfade Sonuçları	122
4.4.3.7. GSTP1 Geninin İfade Sonuçları	124
4.4.4. Hücre Hatlarındaki Gen İfade Düzeylerinin Genel Değerlendirilmesi	126
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	129
6. KAYNAKLAR	138
EKLER	191
ÖZGEÇMİŞ	196



DOKTORA TEZİ

MULTIPLE MYELOMA KANSER HÜCRELERİNDE BORTEZOMİBE KARŞI OLUŞAN ÇOKLU İLAÇ DİRENÇ MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI

Gül KOZALAK

**Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı**

Danışman: Doç. Dr. Emine ÖKSÜZOĞLU

ÖZET

Multiple Myeloma (MM), kemik iliğinde malign plazma hücrelerinin birikmesiyle karakterize olan hematolojik bir kanserdir. Bortezomib myeloma tedavisinde kullanılan en etkin kemoterapötik ilaçtır. Fakat tedavi sürecinde bortezomibe karşı gelişen ilaç dirençliliği, kemoterapide başarıya ulaşmayı engellemektedir. Kanser hücrelerinde çoklu ilaç dirençlilik genlerinin (MDR) ifadesinin artması ilaç dirençliliğine sebep olan en önemli faktörlerden birisidir. Bu nedenle tez çalışmasında, MM hücrelerinde ilaç dirençliliğiyle ilişkili olan P-gp, MRP-1, MRP-2, MRP-3, MRP-6, MRP-7 ilaç taşıyıcı protein genlerinin ve GSTP1'in ifade düzeyleri araştırılmıştır.

Bu çalışmada, multiple myeloma KMS20 (bortezomibe dirençli) ve KMS28 (bortezomibe hassas) hücre hatlarına MTT testi uygulanarak bortezomibin IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Her iki hücre hattından RNA izolasyonları yapılarak cDNA'lar elde edilmiştir. Çalışılan genlerin ifade düzeyleri qRT-PCR ile analiz edilmiştir.

Gen ifade analizleri sonucunda MM'de bortezomib dirençliliğinden esas sorumlu taşıyıcının P-gp (MDR-1) olduğu bulunmuştur. Bortezomibin büyük olasılıkla GSTP1 ile glutatyonlanarak MRP taşıyıcılarıyla hücreden atıldığı düşünülmektedir. MRP-7'nin bortezomib dirençliliğinden sorumlu olduğu ilk kez bu çalışmayla açığa çıkmıştır. Ayrıca uzun süre yüksek bortezomib dozuna maruz kalmayla MRP-1 ifadesinin ortaya çıktığı ve bu durumdaki MRP-2'nin bortezomib dirençliliği gelişiminde kısmen etkili olduğu da tespit edilmiştir. MRP-6 ifadesinin bortezomib dirençliliğiyle ilişkisinin olmadığı ilk kez bu çalışmayla gösterilmiştir. MRP-3 ifadesi kullanılan her iki hücre hattında da tespit edilmemiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda ifadesi yüksek olan genler uygun siRNA'lar veya baskılayıcı moleküller kullanılarak engellenebilir. Multiple myeloma için bu çalışmayla birlikte diğer tüm dirençlilik mekanizmalarının aydınlatılmasıyla tedavi şekillerinin kişiye özel olarak geliştirilmesi de mümkün olabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Multiple myeloma, Bortezomib, İlaç dirençliliği, MDR, Kanser.

Ocak, 2019; 196 sayfa

PhD. THESIS

INVESTIGATION OF MULTIPLE DRUG RESISTANCE MECHANISM DEVELOPED AGAINST TO BORTEZOMIB IN MULTIPLE MYELOMA CANCER CELLS

Gül KOZALAK

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

Supervisor: Doç. Dr. Emine ÖKSÜZOĞLU

ABSTRACT

Multiple Myeloma (MM) is a hematological cancer characterized by accumulation of malignant plasma cells and bortezomib is the most effective chemotherapeutic used in treatment. However, drug resistance prevents success of chemotherapy in treatment process. One of the factors causing resistance is overexpression of multiple drug resistance genes (MDR). Therefore, in this study expression levels of MDR-1 (Pgp), MRP-1, MRP-2, MRP-3, MRP-6, MRP-7 and GSTP-1 genes in MM cell lines were investigated.

IC₅₀ values of bortezomib were determined by MTT assay in KMS20 (bortezomib resistant) and KMS28 (bortezomib sensitive) multiple myeloma cell lines. RNA was isolated from both cell lines and cDNAs were obtained. Expression levels of investigating genes were analyzed by qRT-PCR.

As a result of gene expression analysis, it was found that P-gp (MDR-1) was the main responsible transporter for bortezomib resistance in MM. Bortezomib is strong probably thought to be excreted from the cell with MRP transporters by glutathione with GSTP1. This was the first time that MRP-7 expression was responsible for bortezomib resistance. In addition, MRP-1 expression appears with prolonged exposure to high bortezomib doses and in the same condition MRP-2 is partially effective in the development of bortezomib resistance. This is the first report that MRP-6 expression was not associated with bortezomib resistance. MRP-3 expression was not detected in both cell lines. According to the results of this study, genes with high expression can be prevented by using appropriate siRNAs or suppressive molecules. Through the results of this study and solving all other resistance mechanisms for multiple myeloma are be possible to develop personalized treatment forms.

Key Words: Multiple myeloma, Bortezomib, Drug Resistance, MDR, Cancer.

January, 2019; 196 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kanser hücrelerinin çoğalması	4
Şekil 2.2. Kan hücrelerinin farklılaşması	5
Şekil 2.3. Hematolojik kanser çeşitleri	6
Şekil 2.4. B hücre olgunlaşması	8
Şekil 2.5. İmmünoglobülin tipleri	9
Şekil 2.6. A) Normal ve MM kemik iliğinin karşılaştırılması B) MM klinik görünümü C) MM'li bir hastanın kemiklerindeki değişim	10
Şekil 2.7. Ubikitin proteozom sistemi	18
Şekil 2.8. Proteozom inhibitörlerinin etkileri	20
Şekil 2.9. Bortezomibin kimyasal yapısı ve ticari formu	23
Şekil 2.10. İlaç dirençliliği mekanizmaları	28
Şekil 2.11. MM hücresindeki ilaç direnci mekanizmaları	29
Şekil 2.12. ABC taşıyıcılarının genel görünümü	30
Şekil 2.13. MRP ailesi ve yapısı	32
Şekil 2.14. ABC taşıyıcılarının üç boyutlu yapısı	33
Şekil 2.15. ABC taşıyıcılarının substrat taşıma mekanizması	34
Şekil 2.16. ABC taşıyıcılarıyla ilaçların taşınması	35
Şekil 2.17. P-gp'nin ilaç taşıma mekanizması	37
Şekil 2.18. ABC taşıyıcılarının hücre membranlarındaki yerleşimi	39
Şekil 2.19. MRP taşıyıcılarıyla GSH etkileşiminin dört muhtemel mekanizması	41
Şekil 2.20. İlaçların vücuttan uzaklaştırılması	56
Şekil 2.21. GSH ve dokulardaki dönüşümü	57
Şekil 2.22. GST'lerin yapısı ve çalışma mekanizması	59
Şekil 2.23. GST aracılığıyla ilaçların atılımı	60
Şekil 2.24. Apoptozis mekanizması	64
Şekil 2.25. NF-KB sinyal yolları	65
Şekil 2.26. MM'de kemik iliği mikro çevresi etkisiyle gerçekleşen ilaç direnci mekanizmaları	68
Şekil 3.1. Hücre hatlarının ışık mikroskobu altındaki 1. gün görüntüsü	75
Şekil 3.2. Hücre hatlarının ışık mikroskobu altındaki 20. gün görüntüsü	75
Şekil 3.3. Thoma lamında KMS20 hücre hattı hücrelerinin sayımı	76
Şekil 3.4. MTT testi sonucu KMS28 hücre hattı üzerinde oluşan kristaller	79
Şekil 3.5. KMS20 hücre hattında 48 saat sonucu MTT ile oluşan renk değişimi	79
Şekil 3.6. Gen ifade analizi için kullanılacak 96'lık PCR plağının tasarımı	84
Şekil 4.1. Bortezomib dozunun artışına bağlı olarak hücre hatlarının hayatta kalma grafikleri	86
Şekil 4.2. Hücre hatlarının 24 ve 48 saatlerdeki IC ₅₀ değeri grafikleri	87
Şekil 4.3. Hücre hatlarından izole edilen RNA'ların agaroz jel görüntüleri	88
Şekil 4.4. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak P- gp geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği	91
Şekil 4.5. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak P- gp geni RQ sonuçları grafiği	92
Şekil 4.6. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-1 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği	93
Şekil 4.7. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-1 geni RQ sonuçları grafiği	94

Şekil 4.8. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-2 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.	95
Şekil 4.9. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-2 geni RQ sonuçları grafiği.	96
Şekil 4.10. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-6 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.	97
Şekil 4.11. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-6 geni RQ sonuçları grafiği.	98
Şekil 4.12. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-7 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.	99
Şekil 4.13. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-7 geni RQ sonuçları grafiği.	100
Şekil 4.14. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak GSTP1 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.	101
Şekil 4.15. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak GSTP1 geni RQ sonuçları grafiği.	102
Şekil 4.16. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak P-gp geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.	103
Şekil 4.17. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak P-gp geni RQ sonuçları grafiği.	104
Şekil 4.18. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-1 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.	105
Şekil 4.19. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-1 geni RQ sonuçları grafiği.	106
Şekil 4.20. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-2 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.	107
Şekil 4.21. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-2 geni RQ sonuçları grafiği.	108
Şekil 4.22. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-6 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.	109
Şekil 4.23. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-6 geni RQ sonuçları grafiği.	110
Şekil 4.24. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-7 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.	111
Şekil 4.25. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-7 geni RQ sonuçları grafiği.	112
Şekil 4.26. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak GSTP1 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.	113
Şekil 4.27. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak GSTP1 geni RQ sonuçları grafiği.	114
Şekil 4.28. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki P-gp geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.	115
Şekil 4.29. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki P-gp geni RQ sonuçları grafiği.	116
Şekil 4.30. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-1 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.	117
Şekil 4.31. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-1 geni RQ sonuçları grafiği.	118
Şekil 4.32. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-2 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.	119

Şekil 4.33. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-2 geni RQ sonuçları grafiği.	120
Şekil 4.34. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-6 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.	121
Şekil 4.35. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-6 geni RQ sonuçları grafiği.	122
Şekil 4.36. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-7 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.	123
Şekil 4.37. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-7 geni RQ sonuçları grafiği.	124
Şekil 4.38. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki GSTP1 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.	125
Şekil 4.39. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki GSTP1 geni RQ sonuçları grafiği.	126
Şekil 4.40. Hücre hatlarının 24 ve 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MDR ilişkili genlerin ifade düzeylerinin grafiği.....	127
Şekil 4.41. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MDR ilişkili genlerin ifade düzeylerinin grafiği.....	128

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. MM'in farklı sistemlere göre evrenlenmesi.....	13
Çizelge 2.2. MM tedavisine cevap kategorileri.....	14
Çizelge 2.3. ABC taşıyıcılarının genel özellikleri.....	53
Çizelge 4.1. Hücre hatlarının 24 ve 48 saat sürelerdeki IC ₅₀ değerleri.....	87
Çizelge 4.2. Hücre hatlarından izole edilen RNA'ların konsantrasyonları.....	89
Çizelge 4.3. Hücre hatlarından izole edilen cDNA'ların konsantrasyonları.....	90
Çizelge 4.4. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak P-gp geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.....	91
Çizelge 4.5. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak P-gp geni RQ sonuçları.....	92
Çizelge 4.6. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-1 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.....	93
Çizelge 4.7. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-1 geni RQ sonuçları.....	94
Çizelge 4.8. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-2 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.....	95
Çizelge 4.9. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-2 geni RQ sonuçları.....	96
Çizelge 4.10. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-6 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.....	97
Çizelge 4.11. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-6 geni RQ sonuçları.....	98
Çizelge 4.12. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-7 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.....	99
Çizelge 4.13. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-7 geni RQ sonuçları.....	100
Çizelge 4.14. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak GSTP1 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.....	101
Çizelge 4.15. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak GSTP1 geni RQ sonuçları.....	102
Çizelge 4.16. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak P-gp geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.....	103
Çizelge 4.17. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak P-gp geni RQ sonuçları.....	104
Çizelge 4.18. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-1 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.....	105
Çizelge 4.19. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-1 geni RQ sonuçları.....	106
Çizelge 4.20. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-2 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.....	107
Çizelge 4.21. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-2 geni RQ sonuçları.....	108
Çizelge 4.22. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-6 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.....	109
Çizelge 4.23. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-6 geni RQ sonuçları.....	110

Çizelge 4.24.	Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-7 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.....	111
Çizelge 4.25.	Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-7 geni RQ sonuçları.	112
Çizelge 4.26.	Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak GSTP1 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.....	113
Çizelge 4.27.	Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak GSTP1 geni RQ sonuçları.	114
Çizelge 4.28.	Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki P-gp geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.....	115
Çizelge 4.29.	Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki P-gp geni RQ sonuçları.	116
Çizelge 4.30.	Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-1 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.....	117
Çizelge 4.31.	Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-1 geni RQ sonuçları.	118
Çizelge 4.32.	Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-2 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.....	119
Çizelge 4.33.	Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-2 geni RQ sonuçları.	120
Çizelge 4.34.	Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-6 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.....	121
Çizelge 4.35.	Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-6 geni RQ sonuçları.	122
Çizelge 4.36.	Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-7 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.....	123
Çizelge 4.37.	Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-7 geni RQ sonuçları.	124
Çizelge 4.38.	Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki GSTP1 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.....	125
Çizelge 4.39.	Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki GSTP1 geni RQ sonuçları.	126

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABC	ATP Binding Cassette transporters
Akt	AKT serine/threonine kinase
ALL	Acute Lymphoblastic Leukaemia
AML	Acute Myeloid Leukemia
ARA	Anthracycline Resistance Associated protein
Ara-C	Arabinosylcytosine
ATF-6	Activating Transcription Factor 6
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
AZTMP	Zidovudine 5'-monophosphate
B2MG	Beta 2 Mikroglobulin
BAFF	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b
Bax	BCL2 Associated X
Bcl-2	B-cell CLL/Lymphoma 2
Bcl-xL	BCL2 like 1
BCR-ABL	Philadelphia chromosome/translocation
BM	Bone Marrow
BMSC	Bone Marrow Stromal Cells
BTZ	Bortezomib
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate
CD40L	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 5
CFZ	Carfilzomib
cGMP	Cyclic Guanosine Monophosphate
cm²	Santimetrekare
CR	Complete Response
CXCR-4	Chemokine receptor type 4
DHEAS	Dehydroepiandrosterone Sulfate
DJS	Dubin–Johnson Syndrome
dk	Dakika
dL	Desilitre
DMDP	Monodesmethyldiphenhydramine
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNP-SG	2,4-Dinitrophenyl-S-glutathione
dNTP	Deoxynucleotide

DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
E217βG	Estradiol Glucuronide
ECM	Extra Cellular Matrix
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ER	Endoplasmic Reticulum
EST	Expressed Sequence Tags database
FADD	Fas Associated via Death Domain
FAS	Fas cell surface death receptor
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FISH	Fluorescence In Situ Hibridizasyon
FLC	Free Light Chain
FN	Fibronectin
g	Gram
GADD45	Growth Arrest and DNA Damage inducible alpha
GF109203X	Bisindolylmaleimide
GG918	Elacridar
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione disulfide
GST	Glutathione S-Transferase
GSTP-1	Glutathione S-Transferase Pi 1
HDAC	Histone Deacetylases
IAP	Inhibitors of apoptosis proteins
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IFNγ	Interferon gamma
Ig	İmmünoglobulin
IGF-1	Insulin Growth Factor like 1
IgH	Immunoglobulin Heavy chain
I-KB	Inhibitor of nuclear factor Kappa B
IL-6	Interleukin-6
Imid	Immunomodulatory Drugs
IMWG	International Myeloma Working Group
IRE-1	Inositol-Requiring Enzyme 1
JNK	JUN N-terminal Kinase

kb	Kilobyte
kDa	Kilodalton
L	Litre
LTB	Leukotriene B
LTC	Leukotriene C
LTD	Leukotriene D
M	Molar
MAF	Musculo Aponeurotic Fibrosarcoma oncogene
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MARCKS	Myristoylated Alanine-Rich C-Kinase Substrate
Mcl-1	Myeloid Cell Leukemia 1
MDM-2	Mouse Double Minute-2
MDR	Multiple Drug Resistance
mg	Miligram
MGUS	Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance
MiR	Minimal Response
miRNA	MicroRNA
MK571	Leukotriene D4 receptor antagonist, L-660,711
ml	Mililitre
mM	Mili Molar
MM	Multiple Myeloma
MRP-1	ABCC1, Multidrug resistance Related protein 1
MRP-2	ABCC2, Multidrug resistance Related protein 2, (cMOAT)
MRP-3	ABCC3, Multidrug resistance Related protein 3
MRP-4	ABCC4, Multidrug resistance Related protein 4
MRP-5	ABCC5, Multidrug resistance Related protein 5
MRP-6	ABCC6, Multidrug resistance Related protein 6
MRP-7	ABCC10, Multidrug resistance Related protein 7
MRP-8	ABCC11, Multidrug resistance Related protein 8
MRP-9	ABCC12, Multidrug resistance Related protein 9
MSD	Membrane Spanning Domain
MYC	Myelocytomatosis proto-oncogene
NBD	Nucleotide Binding Domain
NBS	Nucleotide Binding Site
NCI	National Cancer Institute

NF-KB	Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NIK250	Dihydropyridine analogue, NIK250
nM	Nano Molar
nm	Nanometre
Noxa	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
NSAID	Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs
ONX0912	Oprozomib, PR-047
ONX0914	Immunoproteasome inhibitor, PR-957
P53	Tumor Protein 53
PARP	Poly(ADP-ribose) Polymerase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PERK	Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3
PGE	Prostaglandin
P-gp	MDR-1 (ABCB1), Multi Drug Resistance protein 1
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PMEA	Para-Methoxyethylamphetamine
POMP	Proteasome Maturation Protein
PR	Partial Response
PSC833	Valspodar
Puma	BCL2 binding component 3
PXE	Pseudoxanthoma Elasticum
RAS	Rat Sarcoma proto-oncogene
rcf	Relative centrifugal force
RNAi	RNA interference
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	Revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transcriptase
sCR	Stringent Complete Response
SD	Stable Disease
siRNA	Small interfering RNA
TBE	Tris borate EDTA
TMD	Transmembrane Domain
TMH	Transmembrane Helix
TNF	Tumor Necrosis Factor

TRAIL	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
U	Ünit
UPR	Unfolded Protein Response
UPS	Ubiquitin Proteasome System
UV	Ultraviyole
V	Volt
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VGPR	Very Good Partial Response
Xbp-1	X-box binding protein 1
α	alfa
ζ	zeta
θ	teta
μ	mü
π	pi
σ	sigma
ω	omega
μM	Mikro Molar
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
5-FU	5-Fluorouracil
ns	0,1234
*	0,0332
**	0,0021
***	0,0002
****	0,0001

1. GİRİŞ

Kanser dünyada en yaygın ölüm nedenlerinden biridir ve günümüzde kansere yakalanma oranı giderek artmaktadır. Kemoterapi, kanser tedavisinde uygulanan en yaygın ve etkili yöntemdir. Ancak, kemoterapi süresince hastaların tedaviye cevap vermemesi veya tedavi sonrası kanserin tekrarlaması sıklıkla görülen bir durumdur. Kanser tedavisinde başarıya ulaşmak için genellikle birden fazla antikanser ilacı uygulanmaktadır. Ancak, sonradan kazanılan ya da tedavi öncesi kişide var olan ilaç dirençliliği, kanser kemoterapisinde başarıya ulaşmayı büyük ölçüde engellemektedir. Bu duruma ‘çoklu ilaç dirençliliği’ (MDR) denilmektedir (Krishan vd., 1997; Gottesman vd., 2002; Yague vd., 2007; Lage, 2008; Baguley, 2010; Shaffer vd., 2012; Saraswathy ve Gong, 2013). Kemoterapiye karşı geliştirilen dirençlilik, pek çok antikanser ilacının hastalar üzerinde beklenen etkisini gösterememesine ve hastalığın ilerlemesine neden olmaktadır.

Multiple myeloma plazma hücrelerinin hastalığıdır, kemik iliğinde plazma hücrelerinin anormal birikmesiyle karakterize olur ve kemik yıkımı, anemi, hiperkalsemi ve böbrek yetmezliği gibi bir veya daha fazla klinik görünümü vardır (Kumar, 2010). Genellikle ortalama 65-70 yaş aralığında görülür. Bortezomib MM tedavisinde klinikte kullanılan FDA tarafından onaylı en etkin kemoterapötik ilaçtır. Fakat tedavi sürecinde bortezomibe karşı gelişen dirençlilik sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Multiple myelomada ilaç direnci; kemik iliği çevresinin değişmesi, anjiyogenezin artması, bağışıklığın bastırılması, artan kemik erimesi, sitokinez ve büyüme faktörleriyle birleştirilmiş anormal sinyal döngülerini kurulmasını da içeren bir seri genetik olayla birleşmiştir (Kyle ve Rajkumar, 2004). MM, kanser türleri içerisinde konumu, sağ kalım süresinin kısalığı ve ilacın hedef dokuya ulaşabilirliğinin zorluğu açısından özgün bir tümördür. Bu nedenle, MM’de çoklu ilaç direnci oluşumlarının önlenmesi veya geciktirilmesi hayati öneme sahiptir.

Bu tezin amacı, MM hücre hatlarında bortezomibe karşı ilaç dirençliliği gelişiminde MDR taşıyıcı protein genlerinin ne düzeyde ifade edildiğinin araştırılmasıdır. Bu çalışmada bortezomibe dirençli ve hassas MM hücre hatlarında P-gp, MRP-1, MRP-2, MRP-3, MRP-6, MRP-7 ve GSTP1 genlerinin ifade düzeyleri ve bunların dirençlilik üzerine etkileri araştırılmıştır. Birçok çalışmada P-gp ve MRP-1’in kanser hücrelerindeki ilaç dirençliliğinde etkisi araştırılmış ve bunların çok etkili dışa

atım pompaları olduğu ortaya konmuştur. Fakat bunların dışında MRP-2, MRP-3, MRP-6 ve MRP-7 genlerinin ilaç dirençliliğinde ne kadar etkili oldukları yeteri kadar çalışılmamıştır. Bu durumda tüm ilaç dirençliliği mekanizmasını sadece P-gp, MRP-1'e bağlamak ve ona uygun tedavi şekli geliştirmek uygun olmamaktadır. MRP-2, MRP-3, MRP-6, MRP-7 ve bunlarla sinerjik bir şekilde çalışan GST'nin ne düzeyde ifade edildiğinin de ortaya çıkarılması yeni ilaç ve tedavi yöntemlerinin gelişmesine katkı sağlayacaktır. Kanseri hücre hatlarında ilaç dirençliliğine neden olan moleküler mekanizmaların incelenmesi, hastalığı moleküler düzeyde anlamayı sağlayacak ve bunun sonucunda kemoterapi için kullanılan ilaç stratejilerinin kişiye özel olarak şekillendirilebilmesi de mümkün olabilecektir.



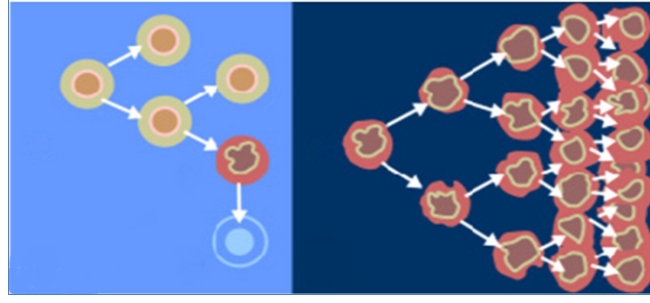
2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Kanser

Kanser, hücrelerin kontrolsüz büyüme ve bölünmesi olup çeşitli doku ve organlarda birikerek insan ölümlerinin %13'ünün nedenini oluşturur (Hamdy, 2012). Vücuttaki normal hücreler düzenli büyüme, bölünme ve ölüm gösterirken kanser hücreleri anormal büyüme ve bölünme gösterir. Normal hücrelerin kanser hücresi haline nasıl geldiği incelendiğinde, altı büyük değişikliğin buna sebep olduğu ortaya çıkmıştır (Hanahan ve Weinberg, 2000; Weinberg ve Chandel, 2009).

- Büyüme sinyallerini kendi kendine oluşturabilme
- Anti-büyüme sinyallerine duyarsız kalma
- Programlı hücre ölümünden kaçma
- Sınırsız çoğalma potansiyeli
- Sürekli anjiyogenez (damarlanma) yapabilme
- Doku invazyonu ve metastaz yapabilme

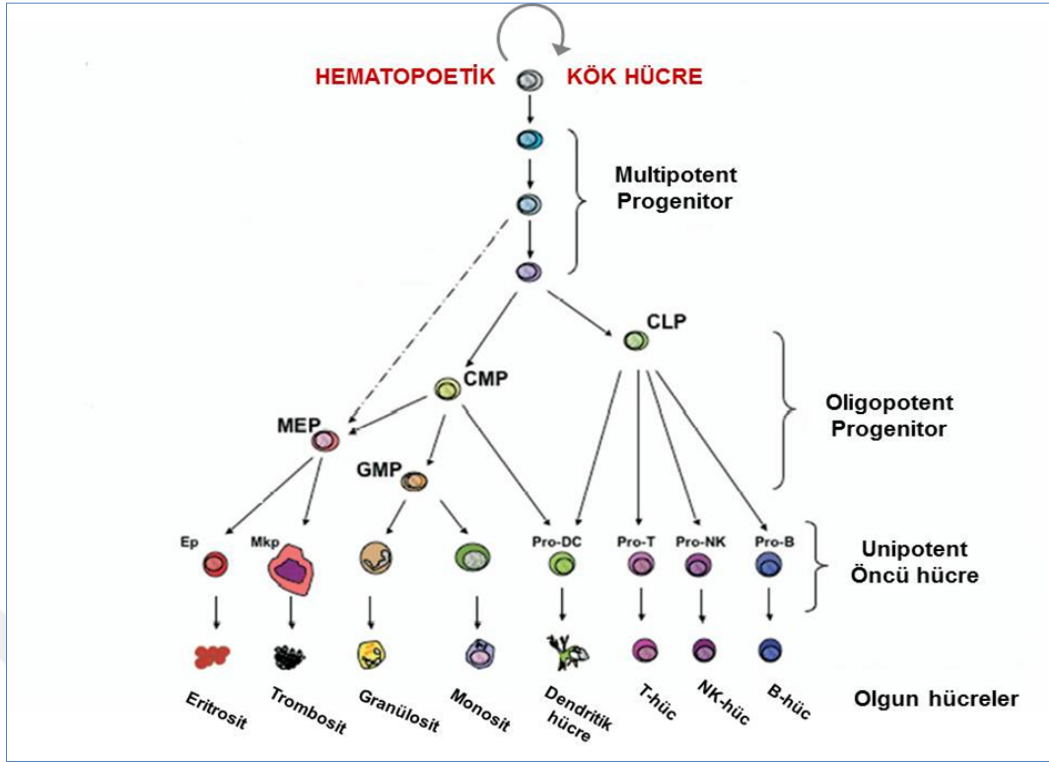
Normal hücrelerin kanserli hücreye dönüşmesindeki genetik anormallikler tipik olarak iki sınıf genleri etkiler. Kanseri teşvik eden protoonkogenler kanser hücrelerinde aktif olup bu hücrelere hiperaktif büyüme, bölünme, programlı hücre ölümünden korunma, normal doku sınırlarının kaybı ve çeşitli doku çevrelerine uyabilme yeteneği gibi yeni özellikler verirler (Knudson, 2001). Diğer kanser hücrelerinde inaktif olan tümör süpresör genleri olup antiproliferasyon sinyallerini, mitoz ve hücre büyümesini baskılayan genleri kodlar. Bunun sonucunda hücreler doğru DNA replikasyonu, hücre döngüsünün kontrolü, dokular içine yönelme, adhezyon ve immün sistemin koruyucu hücreleriyle etkileşim gibi normal fonksiyonlarını kaybeder (Merlo vd., 2006). Sonuç olarak kanser, onkogenlerin işlev kazanması ve tümör süpresörlerin fonksiyonunu kaybetmesiyle ortaya çıkan hücrelerin kontrolsüz proliferasyonudur (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Kanser hücrelerinin çoğalması (Hamdy, 2012).

Kansere neden olan etmenler arasında mutasyon, karsinojenler, iyonize radyasyon ve viral veya bakteriyel enfeksiyonlar sayılabilir. Fakat bazen tüm bunlar olmaksızın da hastalarda kanser gelişebilir. Çünkü kanser, bir ailede tek bir bireyde veya birden fazla bireyde görülmesine bakılmaksızın genetik bir hastalıktır. Kanser insanları her yaşta hatta fetüste bile etkileyebilir, fakat özellikle kanser çeşitleri yaşın artmasıyla artar (Hamdy, 2012). Çeşitli hücrelerde doku ve organ tutulumu yaparak vücudun her yerinde görülebilir. Özellikle hematolojik kanserlerin tüm vücuda yayılma olasılığı daha yüksektir. Çünkü kan sayesinde tüm dokulara ulaşarak, invazyon ve metastaz yapabilir. Bu kanserler her yaşta görülebileceği gibi 20 yaş altında sık olarak gözlenir ve kansere bağlı ölümlerin de başında gelir. Hematolojik kanserleri anlayabilmemiz için öncelikle kan hücrelerini tanımamız gereklidir. Kan hücreleri kemik iliğinde yer alan pluripotent kök hücrelerin bölünüp çoğalması ve farklılaşması ile oluşur. Pluripotent kök hücreleri iki öncül hücre grubunu oluştururlar (Şekil 2.2.).

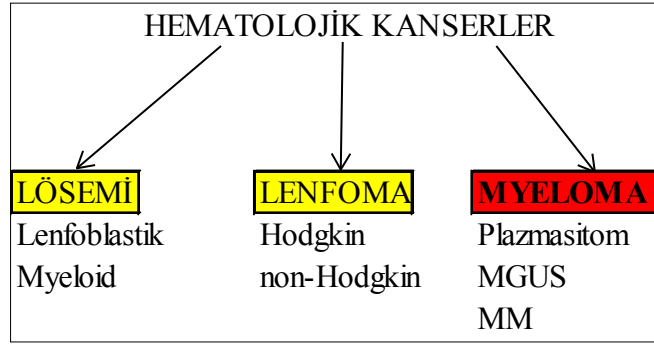
- Lenfoid kök hücresi: (T ve B lenfositler)
- Myeloid kök hücresi: (eritrositler, trombositler, monositler, granülositler)



Şekil 2.2. Kan hücrelerinin farklılaşması (Weissman ve Shizuru, 2008).

Eritrositler (alyuvarlar, kırmızı kan hücreleri), vücudun tüm bölümlerine oksijen taşıırken trombositler megakaryosit parçalarından oluşur ve kanın pıhtılaşmasında rol oynar. Lökositler (beyaz kan hücreleri), bağışıklık sisteminin temelini oluşturan lenfositlerden; myeloid hücreler olan nötrofiller, monositler, eozinofiller ve bazofiller granülositlerden oluşmaktadır. Lökositler bakteri veya virüslere saldırarak yok ederler, granülositler çeşitli bağışıklık süreçlerinde yer alırlar.

Hematolojik kanser çeşitleri bu hücrelerden köken alan kanserler olup lösemi, lenfoma ve myeloma olmak üzere üçe ayrılır (Şekil 2.3.). Kısaca bahsedecek olursak lösemi, kan ve kemik iliğinden köken alan bir kanser türüdür. Lenfositik ve myelojenöz lösemi olmak üzere iki ana tipi vardır. Lenfoma, lenfatik sistemden kaynaklanan kanserleri tanımlar. Sıklıkla lenf nodlarından köken alır, Hodgkin ve non-Hodgkin lenfoma olmak üzere iki ana grupta incelenir. Myeloma, bağışıklık sisteminde rol alan plazma hücrelerinin kanseridir.



Şekil 2.3. Hematolojik kanser çeşitleri.

2.2 Multiple Myeloma

Multiple myeloma monoklonal protein üretmekten sorumlu, kemik iliğindeki plazma hücrelerinin tek bir çeşidinin çoğalması ve yayılmasıyla karakterize olan hematolojik bir kanser türüdür. MM normalde kemik iliğinde bulunan plazma hücreleri kanserlerinin en sık görülen çeşididir (Kumar, 2010). Her yıl Birleşmiş Devletlerde 20.000'in üzerinde hastayı etkileyerek aynı zamanda 11.000'e yakının ölümüne sebep olan lenfomadan sonra ikinci en yaygın hematolojik tümördür (Jemal vd., 2009). USA'deki her yıl genel nüfus içindeki oranı 4/100.000 olup, erkekler kadınlardan daha sık etkilenmektedir. Siyah popülasyonda oran daha yüksekken beyazlar içinde Asyalılarda oran daha düşüktür (Longo, 2001). Tüm kanserlerde olduğu gibi MM'de de malign değişim tek bir hücrede başlar ve bu hücrenin bölünmesiyle vücudun ihtiyacı olmayan hücreler oluşarak birikir.

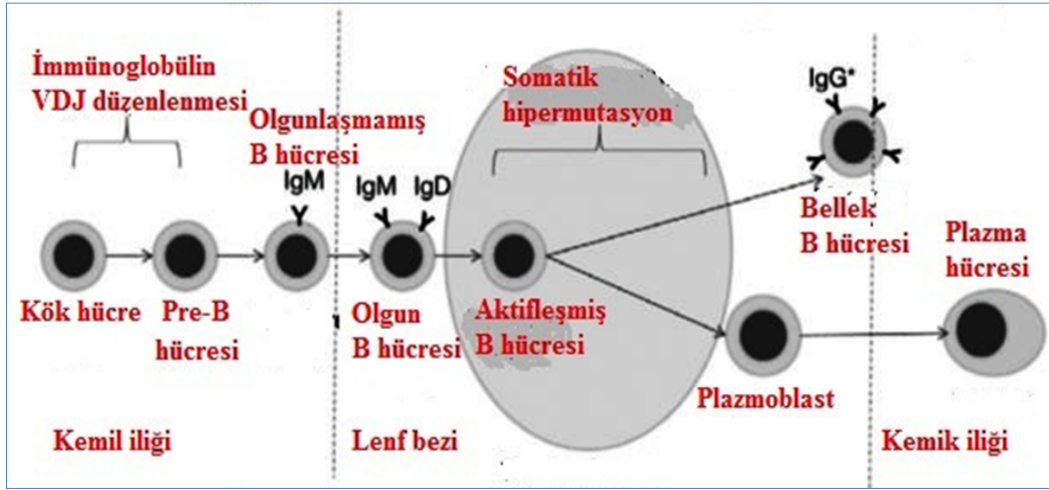
MM hastalığında malign değişim B lenfositlerinde gerçekleşir. Lenfositler immün sistemin çok önemli hücreleridir. Görünümleri birbirine çok benzeyen ve ışık mikroskopunda ayırt edilemeyen T ve B lenfosit olmak üzere iki lenfosit çeşidi vardır. Timus (T hücreleri) veya kemik iliğinde (B hücreleri) olgunlaşırlar. MM hastalığının kökeni olan B hücrelerinin yüzeyinde antijen reseptörleri, immunglobulin reseptörleri, adhezyon molekülleri ve MHC molekülleri bulunur. Bu hücrelerin antijene bağlanma yeteneğinin gelişmesi sekonder lenfoid organlarda ve lenf foliküllerinin kendine özgü mikro çevresinde, T hücrelerine bağımlı olarak gerçekleşmektedir. Organizmaya antijen girdiğinde, yüzeyinde bu antijene özgül reseptör taşıyan B lenfositleri bulur ve uyarır. Uyarılan B lenfositler değişime uğrar ve plazma hücresine dönüşürler (Şekil 2.4.). Uyarılmış B hücrelerinin bir kısmı plazma hücresine dönüşürken, diğer kısmı bellek B hücreleri halini alır. Plazma

hücreleri uyaran antijene özgül olan çok miktarda antikor sentezler ve bu antikor çeşitliliği bizim bağışıklık sistemimizi oluşturur. Bellek B lenfositleri uzun ömürlüdür (bazen bir ömür boyu) ve aynı antijenle tekrar karşılaştıklarında hızla çoğalarak daha hızlı ve güçlü bir antikor yanıtı oluştururlar (Doan vd., 2013).

Kemik iliğinde gerçekleşen B hücre olgunlaşması boyunca üç önemli olay yaşanır (Şekil 2.4.). Bu olaylar;

- İmmünoglobulin Gen Düzenlenmesi: Antikor çeşitliliğini oluşturmak için çekirdekteki DNA'nın düzenlenmesidir. İmmünoglobulin çeşitliliğinin çok geniş olan potansiyelini oluşturmak amacıyla B hücre nesli ve soylarında meydana gelen, gendeki değişken (V), çeşitlilik (D) ve birleşme (J) segmentleri düzenlenerek her bir B hücresi belli bir immünoglobulin ve ona spesifik bir antijen tanıma bölgesini üretir (Sawyer, 2011; Kumar vd., 2012; Sonneveld vd., 2016).
- Somatik Hipermutasyon: Genellikle antijen sunumu sırasında lenf nodüllerinin çekirdek bölgesinde gerçekleşir. İmmünoglobulin ve antijen arasında daha iyi bir etkinlik oluşması için antikor bağlanma bölgesinin özel olarak ayarlanmasını sağlar (Doan vd., 2013).
- Sınıfsal Geçiş: Patojenin kökünün kurutulması için en uygun immünoglobulin sınıfının ve B hücresinin uyarılmasını gerçekleştirir. Böylelikle antijen sunumundan önce üretilmiş IgM, IgG, IgA, IgE daha sonra aynı antijenle karşılaşınca hızlı ve yüksek bir yanıtın oluşmasını sağlayan plazma hücreleri veya B hücre soyunun son evresi olan, bol miktarda antikoru ürettiğini sağlayan bellek B hücrelerine dönüşür (Kyle ve Katzmann 1997).

Bu olaylardan bazıları B hücrelerine proliferasyonda, bazıları ise apoptozise dirençte avantaj sağlar. Bu üç evre boyunca meydana gelen hataların B hücre neslinde kanseri oluşturmada kritik olduğu düşünülmektedir (Egan vd., 2016). Etkilenen lenfositler plazma hücreleri görünümündeki malign myeloma hücrelerine dönüşür.

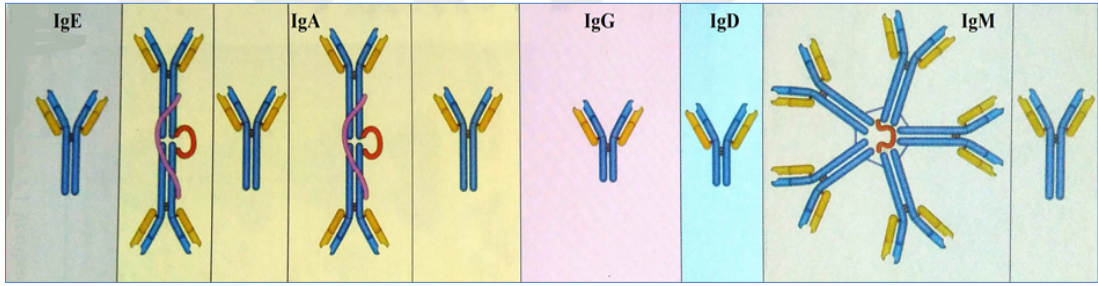


Şekil 2.4. B hücre olgunlaşması (Borrello, 2012).

Multiple myelomada aşırı miktarda artan myeloma hücrelerinin hepsi tek ya da monoklonal özellikte antikora (M proteini) sahiptir. Bu antikor serum elektroforezinde M bandı da denen, monoklonal veya paraprotein bandı varlığıyla açıkça gösterilir. Plazma hücre kanserlerinin birçok tipi vardır ve bunların hepsi bu monoklonal proteinle ilişkilidir. Bu hastalıklar; kemikten izole edilen plazmasitomlar, ekstramedüler plazmasitomlar, monoklonal gamopati (MGUS) ve MM'dir (PDQ, 2016). Monoklonal plazma hücrelerinin oluşturduğu lokalize tümör plazmasitom olarak adlandırılır. Myeloma hücreleri serumda monoklonal paraprotein tespit edilene kadar belki yıllarca plazmasitom olarak çoğalabilir (Greipp ve Kyle, 1982). Kemik iliği dışında gelişen plazmasitom ekstramedüler plazmasitom olarak adlandırılır. MGUS genel popülasyonda en yaygın görülen plazma hücre bozukluğudur ve hastaların %25-30'unun MM'ye dönüştüğü rapor edilmiştir (Greipp ve Kyle, 1982; Kyle, 1993; Pasqualetti ve Casale, 1997). MM, evrilmiş monoklonal gamopatilerin geç dönemini temsil eder ve tüm hastalarda öncesinde mutlaka MGUS dönemi vardır. MGUS'nin yaşla birlikte yaygınlığı artar, etkilenenlerin %6'ya yakını 60 yaşın üzerindedir (Rajkumar vd., 2006). MM teşhisinin yaş ortalamasının yaklaşık 68 olması MM'den önce MGUS evresinin olduğunu gösterir (Sirohi ve Powles, 2004). Bu yüzden MGUS'li hastalar sürekli kontrol altında olmalıdır.

Plazma hücreleri tarafından yapılan immüoglobulin tipine göre çeşitli myeloma türleri vardır. En sık rastlanan IgG myelomadır ve M proteini dört zincirden oluşmaktadır. Bazı hastalarda hafif zincir (kappa ve lambda) myeloma vardır ve anormal plazma hücrelerini sadece hafif zincirler yapmaktadır (Şekil 2.5.). Diğer

bazı hastalarda IgA myeloma vardır ve IgA genellikle birbirine bağlı iki IgG molekülünden oluşmaktadır (Şekil 2.5.). Az sayıda hastada IgM myeloma vardır ve beş IgG molekülü birbirine bağlıdır (Şekil 2.5.). Daha nadir rastlanan diğer myelomalarda IgD ve IgE olarak adlandırılan diğer protein türleri üretilmektedir (Şekil 2.5.). IgG myeloma hastaların %53'ünde, IgA myeloma %25'inde, IgD myeloma %1'inde ve hafif zincir myeloma %20'sinde görülür (Longo, 2001; Kyle ve Katzmann, 1997). Plazma hücre myelomalarının %1'inden daha azı IgM üretir, kalanlarında sınıfsal geçiş başarılmıştır. Bu da somatik hipermutasyon ve sınıfsal geçişinin neden olduğu mutajenik tetiklemenin, plazma hücrelerinin monoklonal popülasyon gelişimiyle sonuçlandığı B hücre olgunlaşmasının geç evresinde meydana geldiği önerisini göstermektedir (Egan vd., 2016). Ağır zincir (IgG, A, D, E) ve hafif zincir izotipleri (kappa ve lambda) immünoelektroforez veya immünofiksasyon ile tanımlanır.

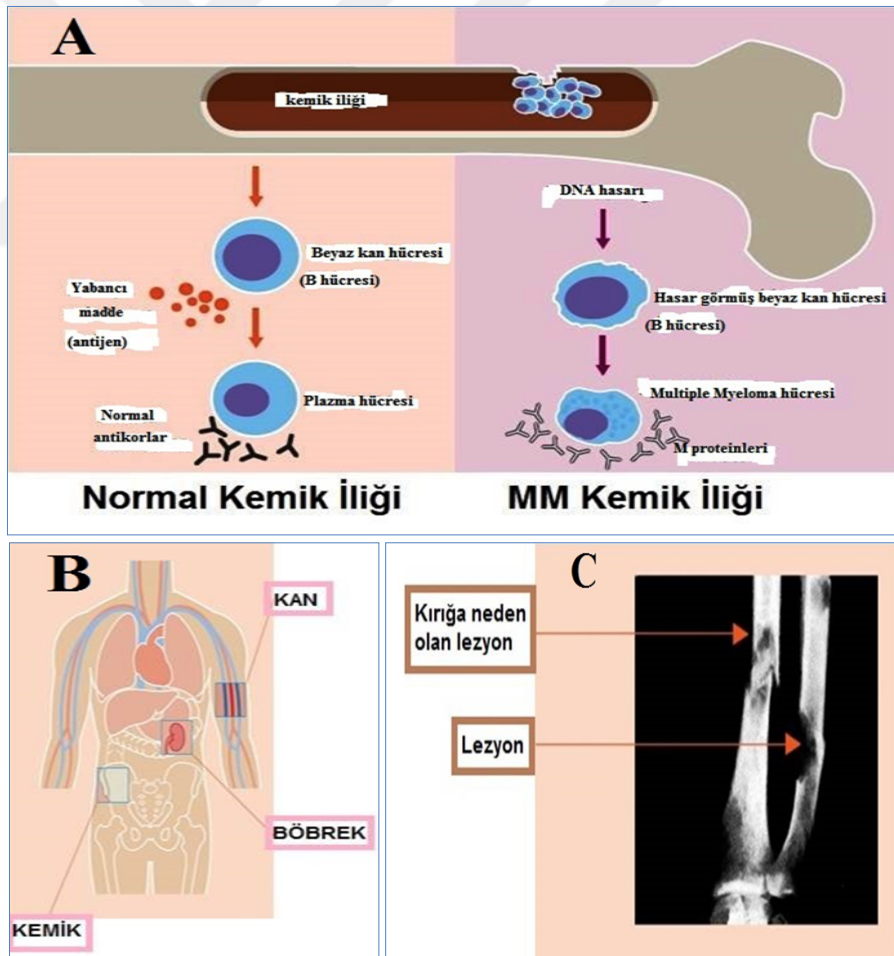


Şekil 2.5. İmmünoglobülin tipleri (Doan vd., 2013).

MM, ortalama 65-70 yaş aralığında görülen kemik iliğinde plazma hücrelerinin birikmesiyle karakterize olan hematolojik bir kanserdir. Kemik yıkımı, anemi, hiperkalsemi ve böbrek yetmezliği gibi bir veya daha fazla klinik görünümü vardır (Şekil 2.6.) (Kumar, 2010). Myeloma hücreleri kendi kopyalarını oluşturmak için bölünerek kemik iliğinde birikir (Şekil 2.6.). Bu artış yüzünden kemik iliğinde normal hücrelerin üretimi bozulurak kemiğin sert kısımlarına zarar verebilirler (Şekil 2.6.). Kemik sürekli olarak osteoklastlar tarafından yıkılarak osteoblastlar tarafından tamir edilmeye çalışılır. Sonuçta kemik yapıcı hücreler bu süreci takip edemez ve kemikte delikler (litik spotlar) oluşur (Şekil 2.6.). Kemik incelir (osteoporozis) yürüme, ağırlık kaldırma ve hapsirme gibi günlük aktiviteler sırasında kırılabilecek kadar zayıflar (Durie, 2016). MM hastalarının yaklaşık %90'ı birden fazla bölgeyi (omurga, kafatası, leğen kemiği, göğüs kafesi, omuzlar ve kalça çevresindeki

alanları) tutan hastalıkla tanımlanır, bu yüzden hastalık ‘multiple myeloma’ olarak isimlendirilir (URL-1).

MM hastalığının tanısı; kemik iliği aspirasyonu ve biyopsisi, kan veya idrarda monoklonal immünglobulinler veya hafif zincirlerinin varlığı, kemik incilmesi ve kemik lezyonu ile yapılır. Hastalardaki M proteini miktarı genellikle MM’nin yaygınlığıyla orantılıdır. Kanda M protein seviyesi artışı hastalığın ilerlemesine işaret eder ve bu seviyenin azalması hastalığın gerilemesini yansıtır. Hem böbreklerdeki anormal proteinlerin etkisi hem de kan kalsiyum seviyesi yüksekliği gibi metabolik değişiklikler böbrek fonksiyonlarını bozduğundan, böbrek fonksiyon testleri ve idrar tetkiki yapılır. Diğer erken belirtiler eller veya ayaklarda periferik nöropati olarak adlandırılan uyuşukluk, karıncalanma, yanma veya ağrıdır (Multiple Myeloma Research Foundation [MMRF], 2015).



Şekil 2.6. A) Normal ve MM kemik iliğinin karşılaştırılması B) MM klinik görünümü C) MM’li bir hastanın kemiklerindeki değişim (MMRF, 2015).

2.2.1 MM Sitogenetiği

Myeloma hücrelerinin malign hücre olduklarını gösteren yapısal anomaliler mevcuttur. Sitogenetik, prognoz faktörü olarak, myelomada giderek artan bir rol oynamaktadır (Wiernik, 2006). G-bantlama karyotiplemesi ve FISH, spesifik kromozom anomalilerini tanımlamakta kullanılan sitogenetik testlerdir. MM'deki en yaygın bulgu anöploididir. MM'nin sınıflanması ilk olarak kromozom numaralarına göre yapılabilir. Hipodiploid grup kötü sağkalımı gösterirken, hiperdiploid grup iyi bir prognozu öngörür (Smadja vd., 1995). Hiperdiploid grup kromozom 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 21'i içerirken (Dao vd., 1994; Sawyer vd., 1995), hipodiploid grup kromozom 13, 14, 16, 22'yi kapsar (Smadja vd., 1998, 2001; Fonseca vd., 2004). Genellikle hipodiploid grup IgH ağır zincirinin 14q32 lokusunda translokasyonlar içerir (Smadja vd., 1998, 2001; Fonseca vd., 2004).

Kromozom 11 ve 14 arasındaki translokasyonlar t(11;14) (q13;q32), MM'de görülen en yaygın kromozomal anormalliktir. Hastaların %15'inde bulunur ve iyi sonuçlarla ilişkili görünmektedir (Fonseca vd., 2002, 2009; Bergsagel ve Kuehl, 2005; Boyd vd., 2012). İkinci en yaygın translokasyon t(4;14) (p16;q32)'dir (Chesi vd., 1998; Santra vd., 2003; Boyd vd., 2012). Bu translokasyon onkogenik reseptör tirozin kinaz olan FGFR3'ü içerir (Kuehl ve Bergsagel, 2002; Zhan vd., 2002; Kalff ve Spencer, 2012). Farklı çalışmalarda değişik tanımlar kullanılmasına rağmen kromozom 14'teki IgH lokusunun translokasyonu t(4;14), MM hastalığında yüksek risk oluşturur. Chang ve arkadaşlarının 2005 yılındaki çalışması da t(4;14) translokasyonunun MM hastalarında kötü prognoza sebep olduğunu önerir. Çalıştıkları t(4;14) pozitif durumların %75'inin FGFR3 ifade ettiği ve FGFR3 pozitif durumların %92'sinin t(4;14) barındırdığını bulmuşlardır. FGFR3 ifadesi IgA izotipiyle ilgilidir ve belirgin olarak kısa bir sağkalım gösterirler (Chang vd., 2005a). t(14;16) (q32;q23) translokasyonu daha az yaygın olmasına rağmen klinikte önemlidir, çünkü IgH geninin (14q32) lokusu ve c-MAF geninin (16q23) lokusunu yanyana getirir. Bu translokasyon %6-7 MM hastasında görülür ve kötü sonuçlarla ilişkilidir (Avet-Loiseau vd., 2007a; Fonseca vd., 2009). Bundan dolayı genetik düzenlemeler sıklıkla MM hastalarının çoğunda anormal olan 14q32'deki IgH zincirinde gerçekleşir (Kuehl ve Bergsagel, 2002). Bu tanımla MM hastalarının yaklaşık %25'inin yüksek riskte olduğu düşünülmektedir (Stewart vd., 2007).

MYC onkogeni ve Ig geni (8q24) lokusu translokasyonu veya amplifikasyonu hastaların %45'inde görülür ve tümör oluşumunun geç dönemini temsil eder (Bergsagel ve Kuehl, 2001; Gabrea vd., 2008). Anomaliler kromozom 13'de ya monozomi ya da delesyon oluşturur ve MM hastalarının %50'sinde bulunur (Tricot vd., 1995, 1997). t(4;14) delesyonları aynı zamanda kromozom 13 monozomisinin yaygınlığı ve kötü sağkalımla ilişkilidir (Fonseca vd., 2003; Keats vd., 2003; Gertz vd., 2005; Avet-Loiseau vd., 2007a). 13q delesyonunun prognostik değeri t(4;14) ve del(17p) ilişkisiyle ilgilidir (Avet-Loiseau, 2007a). 17p delesyonu MM hastalığında yüksek risk oluşturur. 17p13 delesyonu p53 geninin heterozigotluğunun kaybına yol açar ve bu durum MM hastalarının %10'unda rapor edilen geç dönemi temsil eder (Fonseca vd., 2003, 2009; San Miguel vd., 2008; Reece vd., 2009). Bu durum aslında p53'ün hücre döngüsü kontrolündeki anahtar rolünü ve apoptozisi sınırlar, ayrıca başarısız tedaviyi kısmen açıklayabilir. 17q13 delesyonu kötü sonuçla ilişkilidir (Fonseca vd., 2002, 2009). Genel olarak değerlendirildiğinde t(14;16) ve t(4;14) translokasyonuna, 17p delesyonuna, kromozom 13 anomalisine ve tüm bunlarla birlikte yüksek plazma hücre proliferasyonuna sahip olan hastalar ilkin terapilere kısa cevap süresine ve kısa sağkalım süresine sahiptir (Fonseca, vd., 2004; Avet-Loiseau, 2007a; Stewart, vd., 2007).

MM'de yapısal anomalilerin çoğu kromozom 1'de gerçekleşir. Delesyonlar genellikle 1p'de oluşurken amplifikasyonlar 1q'da gerçekleşir (Le Baccon vd., 2001; Qazilbash vd., 2007). Panani ve arkadaşları 2004 yılında 49 hastanın 6'sında bulunan del(1) (p12) delesyonunun çok zayıf bir prognoz olduğunu rapor etmiştir. Bu delesyonun ters etkisinin sebebi bilinmemektedir (Panani vd., 2004). Bu kromozomal değişiklikler hastalığın ne kadar hızlı ilerlediğini gösterir ve en iyi tedavi yaklaşımı kararına katkıda bulunur.

2.2.2 MM Evrenmesi

MM hastalığının evrenmesi için yıllarca Durie-Salmon Sistemi olarak adlandırılan bir sistem kullanılmıştır. Durie-Salmon Sisteminde myelomanın yaygınlığına karar vermek amacıyla kan hemoglobin konsantrasyonu, kan ve idrarda M protein miktarı, kan kalsiyum seviyesi, böbrek fonksiyon seviyesi ve görüntüleme yöntemlerinde kemik lezyonu görünimleri saptanmaktadır (Çizelge 2.1.). Fakat son yıllarda Uluslararası Evrelendirme Sistemi olarak adlandırılan daha yeni ve daha kesin

sonuçları olan bir yöntem kullanılmaktadır. Bu sistem tanı anında hastalık evresi ve prognozunun saptanmasında beta-2 mikroglobulin (B2MG) artış ve serum albümin azalma seviyesine dayanmaktadır. Birçok yayında da B2MG'nin düşük ağırlıklı bir protein olarak sağkalım için bağımsız bir prognoz faktörü olduğu söylenmiştir (Sirohi vd., 1999, 2005; Barlogie vd., 1999). Bu hastalıkta B2MG ve albümin seviyelerine göre Çizelge 2.1.'de gösterildiği gibi bir evreleme yapılır.

Çizelge 2.1. MM'in farklı sistemlere göre evrelenmesi.

MM EVRELEME SİSTEMLERİ		
EVRE	DURİE-SALMON EVRELEME SİSTEMİ	ULUSLARARASI EVRELEME SİSTEMİ
1	Hemoglobin değeri >10,5g/dL	Beta-2 mikroglobülin<3,5mg/L ve albümin≥3,5g/dL
	Serum kalsiyum değeri normal veya ≤12g/dL	
	Kemik x-ray, normal kemik yapısı (skala 0) veya sadece soliter kemik plazmasitom	
	Düşük M bileşeni üretim hızı-IgG değeri<5g/dL; IgA değeri<3g/dL	
	Bence Jones proteini<4g/24 saat	
2	Renal yetmezlik yok (kreatinin≤2mg/dL)	Beta-2 mikroglobülin<3,5mg/L ve albümin<3,5g/dL veya beta-2 mikroglobülin 3,5-5,5mg/L
	Renal yetmezlik (kreatinin>2mg/dL)	
3	Yüksek M bileşeni üretim hızı	Beta-2 mikroglobülin≥5,5mg/L
	IgG değeri>7g/dL; IgA değeri>5g/dL	
	Bence Jones proteini>12g/24 saat	

2.2.3 MM Tedavisi

MM tedavisinin amacı semptomları azaltmak, hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak ve uzun süreli remisyon sağlamaktır. Myeloma hastalığının tedavisi indüksiyon, konsolidasyon ve bakım olmak üzere üç aşamaya bölünür (Brioli vd., 2014). İndüksiyon, tümörün boşaltılmasını; konsolidasyon, kalan tüm tümör hücrelerinin temizlenmesini; bakım terapisi, kalan tümör hücrelerini seçimlerini değiştirmeye zorlamayı tarif eder (Egan vd., 2016).

Kemoterapi: MM tedavisinin esası myeloma hücrelerini öldüren ilaç tedavisidir. Bazı MM hastalarında ilaç tedavisi kalıcı remisyon sağlamıştır. Hastalıkta bir süre için geçici bir duraklama veya ilerlemesinde belirgin bir yavaşlama olabilir.

Otolog kök hücre transplantasyonu: Birçok MM hastası için önemli bir tedavidir. Bu işlemde yoğun kemoterapi sonrasında kan hücresi üretimini yeniden başlatmak için hastanın kendi kök hücreleri kullanılır. Otolog transplantın cevap oranları yüksektir.

Radyasyon Tedavisi: Bu tedavi myeloma hücrelerini öldürmek için x-ray ışınlarını kullanan ve bazı MM hastalarının tedavisinde kullanılabilen bir yöntemdir. Hastalar bazen kök hücre transplantasyonuna hazırlanmak için de radyasyon tedavisi alabilir.

MM hastalığının ilaç tedavilerinde genellikle sitotoksik ilaçlar içeren kombine terapi kullanılması yaygındır. Son yıllarda MM hastalığının ilaç terapilerinde en önemli avantajı proteozom inhibitörleri sağlamıştır. MM hastaları tedavi sayesinde uzun süre yaşayabilirler (Nathwani vd., 2016). Sonuçlar hastalığın evresi, kromozom değişiklikleri, yaş ve diğer medikal problemler gibi hastaya ait faktörlerden etkilenmektedirler. Uluslararası Myeloma Çalışma Grubu (IMWG) tarafından hastanın tedaviye cevabını tanımlamak için kullanılan bazı terimler Çizelge 2.2.'de gösterilmiştir. Standart cevap kategorileri idrar ve kandaki paraprotein seviyeleri, kemik iliği biyopsisindeki plazma hücre yüzdeleri ve tümör hücresi yokluğu ile belirlenmiştir (Paiva vd., 2011; Rawstron vd., 2015; Wester ve Sonneveld, 2016).

Çizelge 2.2. MM tedavisine cevap kategorileri (Durie vd., 2006).

Remisyon:	Hastalık bulgusu yok. Bazen tam remisyon terimi de kullanılmaktadır.
Tam Cevap (CR):	Standart testlerde M proteini bulgusu yok, kemik iliğinde plazma hücreleri yüzdesi normal veya myeloma hücresi bulgusu yok (kemik iliğinde %5 plazma hücresi).
Kesin Tam Cevap (sCR):	Normal serbest hafif zincir oranı ve kemik iliğinde sensitif testlerle myeloma hücrelerinin saptanmaması.
Çok İyi Parsiyel Cevap (VGPR):	Standart testlerde kemik iliğinde myeloma hücresi bulgusu yok.
Parsiyel Cevap (PR):	Kanda M proteininde %50'nin üzerinde düşüş ve 24 saatlik idrarda M proteininde %90'a varan azalma.
Minör Cevap (MiR):	Kanda M proteininde %25-50 azalma.
Stabil Hastalık (SD):	Kanda M proteininde %25'ten daha az bir düşüş veya %25'ten daha az bir artış.
Progresif Hastalık:	Kanda M proteininde en az %25 artış, semptomların eşlik etmesi durumunda tedaviye başlama veya tedavilerin değiştirilmesi gerektiğini işaret eder.

2.3 Ubikitin-Proteozom Sistemi (UPS)

Ubikitin proteozom sistemi, hücrede kompleks ve dinamik proteaz sistemidir (Coux vd., 1996; Hershko ve Ciechanover, 1998). Hücrede %90'a yakın proteinin degradasyonundan sorumlu olup normal hücresel homeostasiyi sağlamada önemli bir rol oynar (Smith vd., 2005; Nalepa vd., 2006) ve ekstralizozomal, sitozolik ve nükleer protein degradasyonu için hücrenin en büyük aracı olarak tanımlanmıştır (Hershko vd., 2000; Glickman ve Ciechanover, 2002; Ciechanover, 2006). Ubikitin

proteozom sistemi, adından da anlaşılacağı üzere iki temel işlem içerir; ubiquitinlenme ve ardından proteozomlarda degradasyon (Şekil 2.7.). Proteinlerin katlanması endoplazmik retikulumda gerçekleşir ve yanlış katlanan proteinler endoplazmik retikulum şaperonlarını içeren bir sistem tarafından tanınır, çoklu ubiquitinlerle işaretlenerek (poliubikitinlenme) 26S proteozom aracılığıyla yıkılır. Protein degradasyonu ile kısa peptidler, 8-10 aminoasit uzunluğundaki peptidlere kesilebilir veya tamamı aminoasitlerine hidrolizlenebilir (Şekil 2.7.) (Reits vd., 2003). Bunlar daha sonra protein sentezinde geri çevrilebilir (Rock vd., 2002; Hitzerd vd., 2014).

Ubikitin, 76 aminoasitlik küçük bir peptid olup genellikle proteinlerin 26S proteozoma hedeflenmesi için bir ubikitin molekülünün proteine eklenmesi gereklidir. Proteine ubikitin eklenmesi, spesifik protein ligazlar içeren çok basamaklı bir işlemdir ve bu olay ubikitinasyon olarak adlandırılır. Ubikitinasyon işlemi üç sınıf enzim gerektirir; (E1) ubikitin aktive edici enzim, (E2) ubikitin bağlayan enzim, (E3) ubikitin-protein ligaz. E1'in aktif bölgesinde yer alan sistein kısmı ve ubikitin C-terminalde bulunan glisin kısmı arasında ATP hidrolizi gerektiren bir reaksiyonla yüksek enerjili tiyol ester bağı oluşturarak ubikitini aktive eder. Aktiflenmiş ubikitin kısmı ek bir tiyol ester bağıyla daha sonra E2'ye transfer edilir ve son olarak izopeptid bağıyla proteini hedeflemek için ubikitinden kovalent bağını katalizleyen E3'e transfer edilir (Şekil 2.7.). Ubikitinasyon, sürekli döngülerle hedef proteinin degradasyon için 26S proteozom tarafından tanınma sinyalini sağlayan poliubikitinasyon zincirinin eklenmesiyle sonuçlanır (Hershko ve Ciechanover, 1998; Glickman ve Ciechanover, 2002).

Proteozomlar sitozol ve nükleusta bulunan ve bu iki kompartıman arasında mekik dokuyan hücredeki proteinlerin degradasyonundan sorumlu geniş, çok alt üniteli komplekslerdir (Reits vd., 1997; Buac, vd., 2013). Gelişimin düzenlenmesi, farklılaşma, proliferasyon, hücre döngüsü, apoptozis, gen transkripsiyonu, sinyal iletimi, yaşlılık, antijen sunumu, immün aktivasyon, inflamasyon, stres cevabı, hücresel olayları yöneten degradasyon ve hücresel proteinlerin proteolitik olayları için önemlidir (Kloetzel, 2001; Naujokat ve Hoffmann, 2002; Krüger vd., 2003; Wolf ve Hilt, 2004). Farklı hücre tiplerinde farklı çeşitte proteozomlar bulunmasına rağmen, hepsinin işlevi protein degradasyonudur (Vigneron ve Van den Eynde,

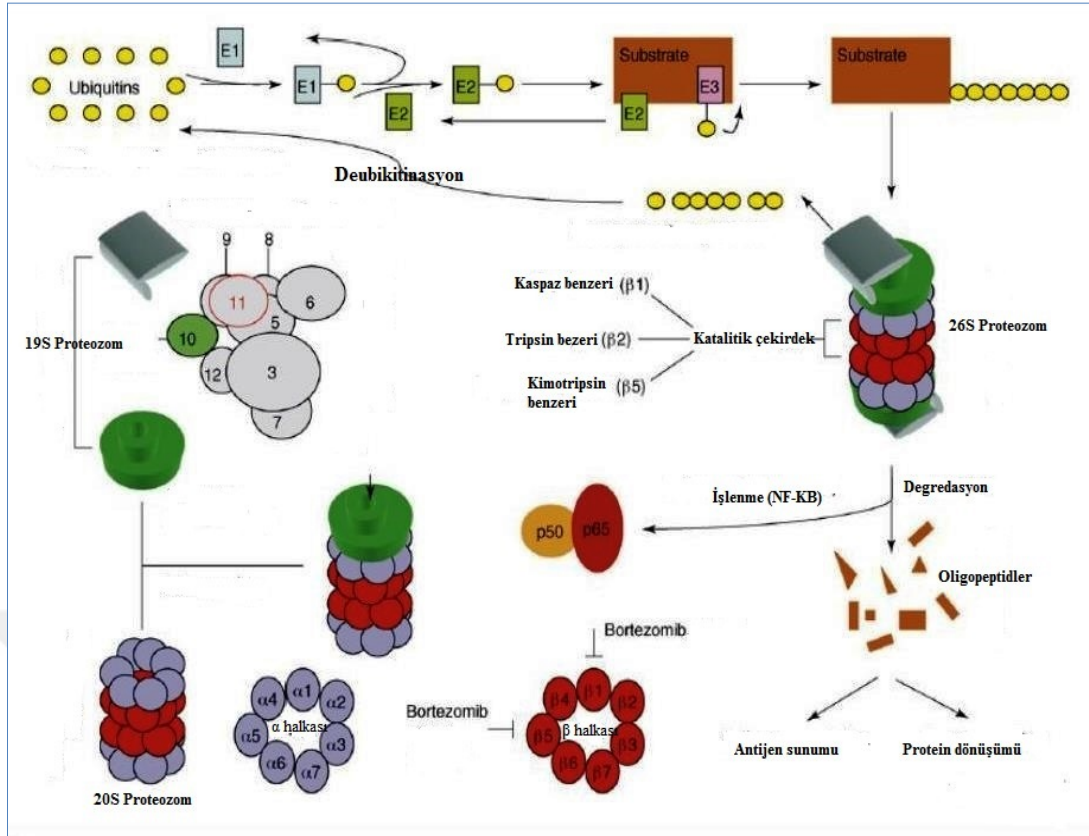
2012; Kniepert ve Groettrup, 2014). Bunlar içerisinde belli başlı olanları 26S proteozom ve immünoproteozomdur.

26S yapısal proteozom (19S-20S-19S) geniş multikatalitik altüniteli proteaz kompleksi, ubikitin-proteozom sisteminin merkezi proteolitik makinesini oluşturur. 26S proteozom, proteinleri küçük peptidlere bölen ATP bağımlı proteolitik bir kompleks olup, halka şekilli 19S düzenleyici, 20S katalitik çekirdek bileşenleriyle çok sayıda polipeptid alt bileşenleri içeren büyük bir proteaz olarak tanımlanmıştır (Hoeller ve Dikic, 2009). 20S katalitik çekirdek, silindirik yapıda bir boşluk olup 14 farklı polipeptidin sıralanmasıyla oluşmuş 4 yığılmış halkadan (7 α -altüniteden oluşan iki eş halka, 7 β -altüniteden oluşan iki eş halka) oluşur (Şekil 2.7.). α -üniteleri ubikitin bağlı proteinleri proteozoma giriş için açma ve tanımadan sorumluyken, katalitik olarak aktif üç β -altünitesi β 1 (PSMB6- kaspaz benzeri aktivite), β 2 (PSMB7- tripsin benzeri aktivite), β 5 (PSMB5- kimotripsin benzeri aktivite) proteolizi katalizler. Yalnızca β 1, β 2 ve β 5 altüniteleri N-terminal kısımlar tarafından oluşturulan 20S kompleksinin merkezi boşluğuna bakan proteolitik bölgeyi oluşturur (Şekil 2.7.) (Baumeister vd., 1998; Voges vd., 1999). İkisi kimotripsin benzeri, ikisi tripsin benzeri, ikisi kaspaz benzeri bölgeler proteozom inhibitörlerinin çoğu tarafından hedeflenmiştir. Kaspaz benzeri aktivite, peptidleri negatif yüklü asidik aminoasit parçalarından; tripsin benzeri aktivite, pozitif yüklü bazik aminoasit parçalarından; kimotripsin benzeri aktivite, geniş hidrofobik aminoasit parçalarından sonra keser. 19S düzenleyici kompleks tanıma, deubikitinasyon, katlanmama için altı ATPaz ve proteinlerin proteolitik degradasyonundan önce translokasyonu için gereken en az sekiz ATPaz olmayan altünitesi içermesiyle çok yönlü altünite kurulumu gösterir (Xie ve Varshavsky, 2000; Navon ve Golberg, 2001).

İmmünoproteozom (11S-20S-11S) yapısal proteozomların dışında özellikle hematopoietik hücrelerde ifade edilen ek bir biçimdir (Parlati vd., 2009; Roccaro vd., 2010; Groettrup vd., 2010; Niewerth vd., 2013). Memelilerde immün sistemin hücre ve dokuları da immünoproteozom ifade eder. İmmünoproteozom 11S düzenleyici parçası ve katalitik aktif β -altünitelerinin yerleşimiyle [β 1i (PSMB9/LMP2), β 2i (PSMB10/MECL-1), β 5i (PSMB8/LMP7)] yapısal proteozomdan farklıdır. Nispeten spesifik inhibitörlerin gelişimini sağlayan ligand yerleştirme farklılıklarına rağmen immünoproteozomun substrat tercihi yapısal proteozom altüniteleriyle çok benzerdir

(Huber vd., 2012). Yapısal proteozom ve immünoproteozom ubiquitinli proteinleri degrade etme kapasitesi açısından birbirinden farklı değildir (Nathan vd., 2013). Çeşitli immünoproteozom formları, aynı peptidlerle farklı kalite ve farklı oranda kesim gerçekleştirebilir. İmmünoproteozomlar yavaşça değişen bir substrat spesifitesine sahiptir ve MHC sınıf 1 molekülleriyle eşleşebilmek için daha fazla hidrofobik ve bazik C uçları olan ve daha az asidik C uçları olan peptidler üretir (Rock ve Goldberg, 1999). Bu sayede antijen sunumu ve antijen çeşitliliği için peptid çeşitliliği zenginleşmektedir. İmmünoproteozomların esas fonksiyonu MHC sınıf 1 moleküllerine sunmak için antijenik peptid neslini arttırmaktır (Kloetzel ve Ossendorp, 2004).

Ubikitin proteozom sistemi, düzenleyici proteinlerin spesifik olarak hedeflenmiş yıkımı boyunca çok sayıda hücrel ve fizyolojik fonksiyonun düzenlenmesine de katılır. Örneğin ubiquitin proteozom yolağı tarafından siklin ve siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin zamanında degradasyonu olmadan hücre döngüsü ilerlemesi imkansızdır (King vd., 1996). Bu yolak p53, siklinler ve siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörleri p21 ve p27, östrojen reseptörü, NF-KB inhibitörünü (IKB) içeren kısa yaşamlı hücrel düzenleyici proteinlerin temel degradasyon mekanizmasıdır (Nagata vd., 1999; An vd., 2000; Lonard vd., 2000). Proteozom kompleksinin transkripsiyon faktörü NF-KB aktivitesini düzenleyebilmesi hücre için önemlidir. Çünkü NF-KB çeşitli immün ve inflamasyon cevabı düzenler, fakat hücre proliferasyonunu uyarması, apoptozisi engelleme ve anjiyogenezi indüklemesiyle tümöröenezde de rol oynayabilir. Dolayısıyla bu yolaktaki bozukluk kanserdeki kontrolsüz hücre büyümesinin muhtemelen önemli bir etmenidir (Şekil 2.7.).



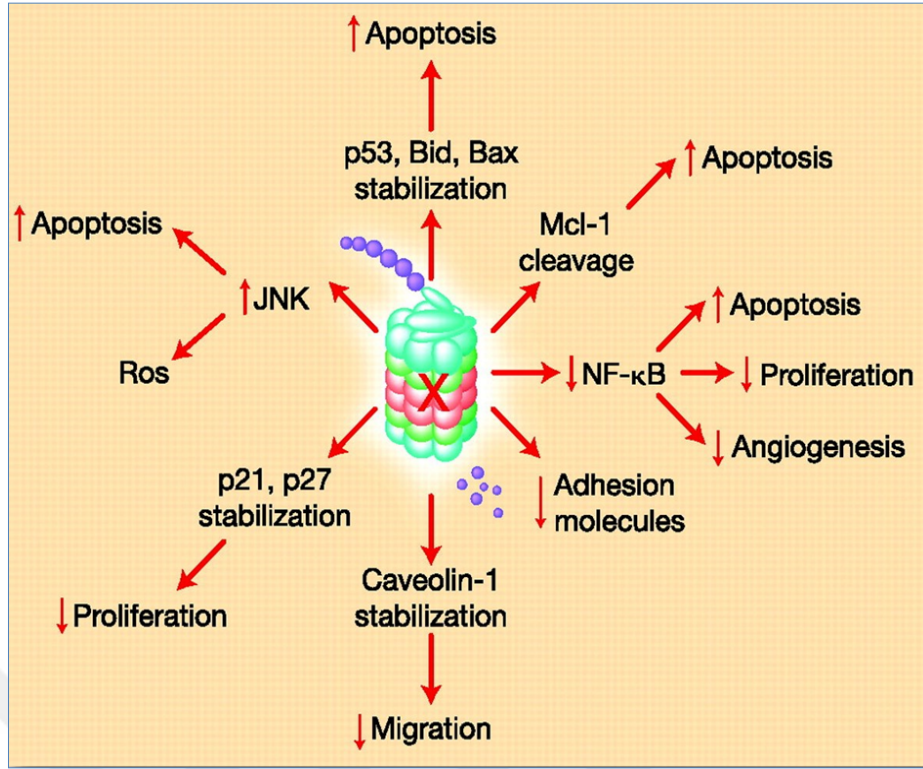
Şekil 2.7. Ubikitin proteozom sistemi (Cvek ve Dvorak, 2008).

Proteozomlar ilaçlar için alışılmadık bir hedeftir çünkü ilaç cevaplarına ince ayar vermeyi sağlayan çok sayıda enzimatik bölge içerir (Kisselev vd., 2012). Proteozomun $\beta 1$, $\beta 2$, ve $\beta 5$ 'in aktif bölgelerinin protein degradasyonu ve hücre büyümesindeki rolü, yönlendirilmiş mutagenезle *S. cerevisiae*'de çalışılmıştır. Mutasyonla $\beta 5$ bölgesinin inaktivasyonu gelişimi geriletir, anormal proteinlerin üretimini artırır, koşullara göre hassasiyeti artırır ve bütün testlerde belirgin bir substrat birikimine neden olur (Chen ve Hochstrasser, 1996; Heinemeyer vd., 1997). Proteozomun $\beta 1$ bölgesinde yapılan benzer mutasyonlar fenotipik hasarlara yol açmaz ve substrat birikimine neden olmaz. Proteozomun $\beta 2$ bölgesindeki inaktivasyonlar yavaşça gelişim oranlarını geriletir ve bazı model substratların degradasyon oranını azaltır (Arendt ve Hochstrasser, 1997; Heinemeyer vd., 1997). Proteozomun $\beta 1$ ve $\beta 2$ bölgeleri inaktif bir maya zinciri, $\beta 2$ bölgesi inaktif zincire göre güçlü bir gelişim hasarı göstermiş, fakat fonksiyonel $\beta 5$ bölgesi engellenmiş zincire göre daha az fenotipik hasar göstermiştir (Heinemeyer vd., 1997). Bundan dolayı $\beta 1$ (kaspaz benzeri) bölgesi fonksiyonel olarak gereksiz gibi görünüyorken $\beta 5$ (kimotripsin benzeri) bölgesi protein bozulmasında çok daha önemli görünmektedir.

Mayada bölgeye özgü yönlendirilmiş mutagenezle yapılan son çalışmalar da bu bölgenin en önemli hedef olduğunu doğrulamıştır. Kimotripsin benzeri bölgelere özel, hücreyi geçebilen inhibitörler geliştirmek için hidrofobik peptidlerden yardım alınır. Çünkü bu bölgeler tercihen hidrofobik kısımlardan sonra kesim yaparlar (Kisselev ve Goldberg, 2001). Bu şekildeki bileşikler hücrelerde protein degradasyonunu engeller. Bu yüzden çeşitli kanserlere karşı kimotripsin benzeri (CP) aktiviteyi engelleyen umut verici birçok ajan üretilmiştir.

2.3.1 Proteozom İnhibitörleri

Proteozom inhibitörleri; ubikitin proteozom sistemini kesintiye uğratar, hücre siklusunu düzenleyen siklin ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri gibi ubikitinlenmiş proteinlerin degradasyonunu engeller bu da proapoptotik faktörlerin birikimine neden olarak sonuçta apoptozisin tetiklenmesini sağlar (Şekil 2.8.) (Lipchick vd., 2016; Naymagon ve Abdul-Hay, 2016). Bundan dolayı bu inhibitörler, seçici olarak apoptozisi indüklemek, proliferasyonu azaltmak ve tümör hücrelerini sitotoksik T hücre ataklarına konvansiyonel tıratpatiklere karşı hassaslaştırmak için yeni bir yaklaşım sağlar (Şekil 2.8.) (Hamdy, 2012). Proteozom inhibitörleri başlangıçta antiinflamasyon ajanı olarak geliştirilmesine rağmen farklı kanser hücrelerinde de hızlı bir apoptozise sebep olduğu keşfedilmiştir (Goldberg, 2010). Özellikle proteozomal aktivitenin proteozom inhibitörleriyle inhibisyonu, tercihen hızlı çoğalabilen kanser hücrelerinde apoptozisi indüklemektedir (Chen vd., 2000; Naujokat vd., 2000; Kisselev ve Goldberg, 2001; Naujokat ve Hoffmann, 2002; Adams, 2004a). Bu bulgular proteozom inhibitörlerinin kanser terapisinde kullanımına yol açmıştır (Rajkumar vd., 2005; Mitsiades vd., 2005; Voorhees ve Orlowski, 2006).



Şekil 2.8. Proteozom inhibitörlerinin etkileri (Wright, 2010).

Multiple myeloma hücrelerinin proteozom inhibisyonuna hassasiyeti, malign B hücrelerinin protein sentezi ve çevrimine bağlı olması, bu nedenle de hasarlı proteinlerin işlenmesi için ubiquitin proteozom sistemine güvenmek zorunda olması gerçeğine dayanmaktadır (Adams, 2004a,b; Meister vd., 2007; Bianchi vd., 2009; Walter ve Ron, 2011; Holkova ve Grant, 2012). Bunun sebebi endoplazmik retikulumda, yanlış katlanmış proteinlerin UPR'ı (katlanmamış protein cevabı) tetiklemesinden kaynaklanmaktadır (Schubert vd., 2000; Yewdell ve Nicchitta, 2006; van Deventer ve Neefjes, 2010; Mayor, 2011). Bu aktivasyon, otofaji ve ubiquitin proteozom sisteminin düzenlenmesinin artışını sağlar, bu durum da krizi önlemek için biriken protein miktarını düşürür (Ding vd., 2007, 2009; McConkey ve Zhu, 2008; White ve Di Paola, 2009; Milani vd., 2009; Zhu vd., 2010; Amaravadi vd., 2011; Zang vd., 2012; Jia vd., 2012; Lilenbaum, 2013). Böylece myeloma hücreleri proteozom inhibitörlerine hassas hale gelir (Obeng vd., 2006; Parlati vd., 2009).

Proteozom inhibitörlerinin 8 önemli sınıfı vardır bunlar; peptid aldehytler, peptid vinin sülfonlar, sirbaktinler, peptid boronatlar, peptid $\alpha'\beta'$ -epoksiketonlar, peptid ketoaldehytler, β -laktonlar ve oksadiazol-2-birler (Kisselev vd., 2012). Proteozom inhibitörlerinin ilk üç sınıfı kendi spesifik olmayan doğalarından ve yaygın toksik

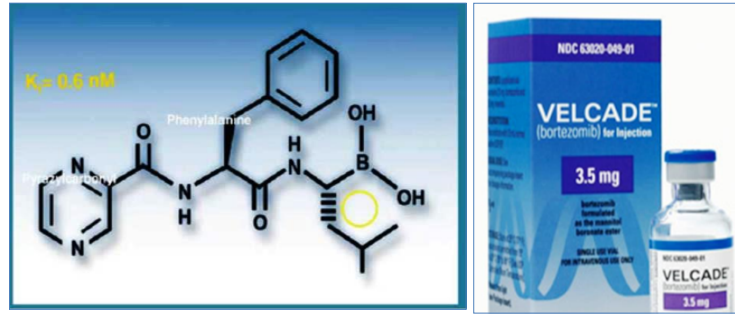
profillerinden dolayı klinik değerlendirmeye geçememiştir. Diğer beş proteozom inhibitörü klinik denemeye alınmıştır ve çeşitli yeni yapısal sınıf proteozom inhibitörleri keşfedilmiştir (Groll ve Huber, 2004; Molineaux, 2012).

Proteozom inhibitör sınıfının ilki olan Bortezomib (BTZ), MM tedavisinde 2003 yılında kabul edilmiştir. Bortezomib başlangıçta MM'in 3. derece tedavisinde kabul edilmişken artık bu hastalığın tedavisinde ilkin olarak kullanımı kabul görmüştür (Richardson vd., 2005; Kisselev vd., 2012). BTZ'in dışında yeni nesil proteozom inhibitörleri de geliştirilmiştir (Arastu-Kapur vd., 2011). Bunlardan biri Carfilzomib (CFZ) geri dönüşsüz bir proteozom inhibitörü olup β 5/kimotripsin benzeri aktiviteyi hedefler (Kortuem ve Stewart, 2013). Epoksi-keton bazlı proteozom inhibitörü CFZ, Birleşik Devletler Gıda ve İlaç İdaresince (FDA) tarafından Temmuz 2012'de, tedavisi güç ve nüksetmiş MM hastalarının tedavisi için onaylanmıştır. CFZ, BTZ tedavisinden sonra nüksetmiş MM hastalarında etkili olduğu kanıtlanmıştır (Siegel vd., 2012). Geri dönüşsüz inhibitörlerin daha sürdürülebilir bir proteozom inhibisyonu sağlaması beklenmektedir, fakat bu inhibisyonun üstesinden gelmek için proteozomların de novo sentezi gerekir. Yapılan son çalışmalarla kimotripsin benzeri aktivitenin iyileşme oranlarının proteozomun geri dönüşlü BTZ ve geri dönüşsüz CFZ ile inhibisyonu sonrası yalnızca minimal bir farklılaşma olması bu hipotezi desteklemektedir (Demo vd., 2007; Suzuki vd., 2011). Diğeri Oprozomib (ONX 0912), CFZ'nin bir oral analogudur ve CFZ ile aynı proteozom inhibisyon profilini gösterir (Zhou vd., 2009). Başka biri olan boronat Ixazomib (MLN 9708), MM hastalarında klinik denemeye değerlendirilen ilk oral kullanılabilir proteozom inhibitörüdür. Marizomib (Salinosporamide A/NPI-0052), β -laktonların bir üyesidir ve sucul bir bakteri olan *Salinispora tropica* tarafından doğal olarak üretilir (Potts vd., 2011). Marizomib, oral olarak kullanılabilen ve proteozomun üç aktif bölgesini hedefleyen, geri dönüşsüz bir proteozom inhibitörüdür (Chauhan vd., 2005a). Marizomible tedavi edilen MM hastaları üzerinde yapılan denemelerde kısmi bir cevaba ulaşılmıştır (Richardson vd., 2011). Delanzomib (CEP-18770), tedavisi zor ve nüksetmiş MM hastalarında değerlendirilen bir diğer oral kullanılabilen geri dönüşlü boranik asit bileşenidir. Son olarak artiritleri içeren immünolojik bozukluklarda en etkili model olan iki geri dönüşsüz immünoproteozom inhibitörü (ONX 0914 ve PR-924) hala klinik öncesi değerlendirmededir (Muchamuel vd., 2009; Basler vd., 2010; Singh vd., 2011). Tek ajan olarak kullanılan proteozom

inhibitörleriyle yapılan hematolojik hastalıklarla ilgili çalışmalar düşük etkinlik ve toksisiteden dolayı çok yetersizken, geleneksel kemotörapatiklerle kombine terapiler (örneğin HDAC inhibitörleri, kortikosteroidler veya diğer proteozom inhibitörleri) daha iyi cevaplar göstermiştir (Hideshima vd., 2005; Miller vd., 2007; San-Miguel ve Mateos, 2011; Chauhan vd., 2010, 2011; McConkey vd., 2012).

2.3.1.1 Bortezomib

Bortezomib (PS-341, Velcade), Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ve Avrupa Tıbbi Ürünlerin Değerlendirilmesi Ajansı (EMA) tarafından MM için onaylanan ilk sınıf proteozom inhibitörüdür (Şekil 2.9.) (Sirohi ve Powles, 2004; Chauhan vd., 2004). Bu yüzden MM tedavisinde klinikte kullanılan en etkin kemoterapötik ilaçlardan biridir. Bu inhibitör NCI Terapi Geliştirme Programına gönderilmiş ve tüm hücre hatlarında denenerek potansiyelinin etkili olduğu gösterilmiştir. Proteozom fonksiyonlarının geri dönüşlü inhibisyonu MM hastalarında optimum antikanser etkisine (yaklaşık %70) ulaşmıştır (Adams vd., 1999; Aghajanian vd., 2002; Orlowski vd., 2002). Bu durum faz 2 denemelerine odaklanmaya ve bu deneme sonuçlarına dayanarak başlangıçta dayanıklı ve nüksetmiş hastalıkta 3. düzeyde (2003), sonra yeni teşhis edilen MM hastalarında ilkin tedavi olarak (2008) FDA tarafından kabulüne izin vermiştir (Richardson vd., 2003). Böylelikle daha önce PS-341 olarak adlandırılan bortezomib, 2003'te bir proteozom inhibitörü olarak Velcade ismiyle ilk kez MM tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Hayashi vd., 2003). Klinik bir perspektiften bakıldığında bortezomib en umut verici proteozom inhibitörüdür. Bortezomib, hayvan xenograft çalışmalarında tümör gelişim oranını azaltmış, anjiyogenezi engellemede belirgin bir yetenek göstermiş (LeBlanc vd., 2002) ve metastazı da azaltarak (Teicher vd., 1999) klinik denemeler için bir gerekçe sağlamıştır. Bortezomibin yalnız veya kombine tedavilerle diğer kanser türlerindeki etkisi de klinik olarak çalışılmaya devam etmektedir.



Şekil 2.9. Bortezomibin kimyasal yapısı ve ticari formu.

Bortezomib dipeptid boronik asit analogu olan, antitümör özelliğe sahip bir proteozom inhibitörüdür. Bu inhibitör 1995'te keşfedilmiş olup kimotripsin benzeri (CP) inhibitörler sınıfının ilkidir. Bortezomib bir C-terminal boronik asittir, bor atomu $\beta 5$ katalitik alt ünitesine spesifik ve sıkıca bağlanma kabiliyetinden dolayı proteozom aktivitesini engellemede çok önemlidir. Bortezomib kimotripsin benzeri bölgelerin inhibitörü olarak geliştirilmiş (Adams ve Kauffman, 2004), fakat sonra kaspaz benzeri bölgeleri de birlikte inhibe edebildiği bulunmuştur (Altun vd., 2005; Berkers vd., 2005; Kisselev vd., 2006). Boronatlar, treoninlerin N-terminal amino grubu ve boronik asidin hidroksil grupları arasında hidrojen bağıyla daha fazla stabilize olan tetrahedral yapışkan uçlar oluşturur (Groll vd., 2006). Bu bağlar bortezomibin inhibisyon için geliştirilen diğer enzimlere göre daha yüksek etkinliğini sağlar (Adams vd., 1998). Proteozomu yüksek bir çözünürlükle bağlar, yavaşça ayrıştır ve stabil fakat tersinir bir proteozom inhibisyonu sağlar.

MM'in neden bortezomibe çok duyarlı olduğu uzun yıllar belirlenememiştir. Görülen etkileri açıklamak için; NF-KB ve diğer antiapoptotik proteinlerin down regülasyonu, tümör baskılayıcı protein p53'ün aktivasyonu, hücre döngüsü proteinlerin ve diğer proapoptotik faktörlerin modülasyonu gibi çeşitli mekanizmalar önerilmiştir. Bortezomibin proteozomları inhibe etmesi, hücre döngüsünün durmasına yol açan, apoptoza neden olan ve anjiyogenezi inhibe eden çeşitli hücre sinyal iletim yollarını bozar. Bortezomib, p53'ün ifadesini indükleyerek stabilitesini artırır ve p53'ün düzenlediği gen ifadesiyle apoptozisi indükler (Ling vd., 2002; Ling vd., 2003a). Bortezomibin durdurduğu G2/M fazında siklin A ve B gibi G2/M fazı düzenleyicilerinin birikimi ve uyarımıyla birlikte p53 proteinin stabilizasyonu ve p21'le MDM2 proteinlerinin indüklendiği görülmüştür (Ling vd., 2003b). Bortezomib proliferatif sinyalleri ileten siklin bağımsız kinaz inhibitörleri olan

p21Cip1 ve p27Kip1 birikimini indükleyen p44/42 MAPK ile EGFR yolağına da müdahale eder (Orlowski, 2005). Kemik iliği çevresindeki stromal hücrelerden salınan IL-6, bortezomibin indüklediği apoptozisten hücreleri koruyamaz. Bortezomib şaperonların upregülasyonunu ve JNK aktivasyonunu tetikler. Üstelik bortezomibin DNA-protein kinaz katalitik subünitesinin parçalanmasını ve ATM proteinini indükleyerek aynı zamanda DNA tamirini engellediği de düşünülmektedir (Hideshima vd., 2003). Şimdiye kadar yapılan çalışmalar bortezomib kullanımının IgH translokasyonlu veya kromozom 13 anomalili hastaları iyileştirebildiğini gösterdiğinden dolayı bu hastalarda öncelikli olarak bortezomib kullanımı önerilir (Jagannath vd., 2007, 2008; Avet-Loiseau vd., 2010; Biran vd., 2013).

Yapılan çalışmalar, bortezomibin transkripsiyonel faktör NF-KB'nin aktivasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. Bu yüzden başlangıçta transkripsiyon faktörü NF-KB'nin ana hedef olduğu düşünülmüştür (Adams ve Kauffman, 2004; Chauhan vd., 2005b). NF-KB, çoğu katı tümörün proliferasyonunda ve kemorezistansında önemli bir rol oynar. Bu etkiyi, NF-KB'nin hücre içi inhibitörü I-KB'nin proteozomal yıkımını engelleyerek gerçekleştirir (Blade vd., 2005; Boccadoro vd., 2005). Myeloma hücrelerindeki NF-KB aktivitesi, kemik iliği stromal hücreleri ile etkileşiminin korunması için önemlidir. Çünkü bu faktör kemik iliği çevresindeki myeloma hücrelerinin gelişimini, yaşamını ve kemorezistansını sağlayan IL-6 ve IGF-1 ifadesini düzenler (Chauhan vd., 2005b). NF-KB aktivasyonu proteozoma bağlı iki basamak içerdiğinden, MM'de bortezomib aktivitesi NF-KB aktivasyonunun inhibisyonu sağlar (Palombella vd., 1994). Fakat bu bortezomibin antineoplastik aktivitesinin en etkin faktörü değildir ve myeloma hücrelerinde NF-KB sinyalinin inhibisyonu proteozomların inhibisyonundan daha hafif bir etkiye sahiptir (Hideshima vd., 2002).

Myeloma hücreleri bütün hücre tiplerinin içinde en çok protein salgılayan hücrelerdir ve IgG veya IgA gibi kompleks moleküllerin büyük kısmını sentezler ve salgırlar (Bianchi vd., 2009; Cenci vd., 2011). IgG çeşitli disülfid bağları içeren dört zincirli bir protein olup düzgün bir şekilde katlanmakta başarısız olunan IgG zincirleri proteozomlar tarafından ER degradasyon yolağı vasıtasıyla yıkılır. Böylece myeloma hücrelerindeki yüksek orandaki IgG biyosentezi proteozomlar üzerinde alışılmadık bir yük yapar. Myeloma hücreleri bundan dolayı daimi bir ER stresi altındadır ve

katlanmamış protein cevabını proteozom inhibisyonu yoluyla kolayca indükleyebilir (Obeng vd., 2006). Üstelik myeloma hücreleri tarafından IgG üretiminin artırılması onların proteozom inhibitörlerine hassasiyetini daha da artırır (Meister vd., 2007).

Sonuç olarak proteozomların bortezomible in vivo olarak kısmi inhibisyonu hastanın normal hücrelerine toksik değilken, myeloma hücrelerini yok etmek için yeterlidir. Bu tümör hücre seçiciliğine çok sayıda faktör katkıda bulunmaktadır (Pleban vd., 2001; Adams, 2003).

- Kanser hücreleri normal hücrelere göre daha hızlı bölünür. Bundan dolayı hücre döngüsünü organize etmesi için hücre siklusunu düzenleyen proteinlerin proteozomal çevrimine normal hücrelerden daha çok bağlıdır.
- Kanser hücreleri kontrolsüz hücre proliferasyonu sebebiyle yanlış katlanmış veya hasarlı proteinleri normal hücrelerden daha hızlı üretiyor gibi görünmektedir.
- Kanser hücrelerinde proteozom miktarının veya proteozomal aktivitenin daha çok uyarıldığı gösterilmiştir.

Bortezomibin klinik denemelerde nüksetmiş hastaların yaklaşık üçte birinde aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Bortezomibin etki mekanizmasının diğer kemotörapatik ajanlardan farklı olmasının nedeni bortezomibin proteozomu hedeflemesidir (Shah ve Orłowski, 2009; Chen vd., 2011). Bortezomib kanser hücrelerinin diğer geleneksel kemotörapatik ajanlara veya radyasyona karşı hassasiyet geliştirebilmesini de sağlamaktadır. Bortezomib tüm bu özelliklerinden dolayı hematolojik kanserlerin tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Blade vd., 2005; Boccadoro vd., 2005). Fakat kanser tedavisinde başlangıçta oldukça etkin cevap alınmasına rağmen, bir süre sonra bortezomibe karşı dirençlilik gelişmektedir.

2.4 Kanserde İlaç Dirençliliği

Kanser tedavisinde uygulanan en yaygın ve etkili yöntem kemoterapidir. Ancak kemoterapi tedavisi boyunca hastaların tedaviye cevap vermemesi veya tedavi sonrası kanserin tekrarlması sık karşılaşılan bir durumdur. Bu duruma neden olan dirençli hücreler ilk teşhis aşamasında bile var olabilir veya spontan mutasyonlarla gelişebilir. Dirençli hücrelerde meydana gelen genetik ve epigenetik değişimler kemorezistansın doğal veya edinilmiş olmasını sağlar (Tomida ve Tsuruo, 2001).

Dirençli hücreler tedavi boyunca seçilerek hassas hücrelerden daha fazla büyür ve yayılır (Goldie ve Coldman, 1983). Çoğu durumda malign hücreler tek bir ilaca dirençli olur, bu durumda ilaç direnci yapısal ve fonksiyonel olarak farklı kemotörapatik ilaçların kombinasyonu ile giderilebilir. Fakat kanser hücreleri çeşitli ilaçlara karşı da aynı anda dirençli olabilirler. Bu duruma 'çoklu ilaç dirençliliği' (MDR) denir (Krishan vd., 1997; Gottesman vd., 2002; Yague vd., 2007; Lage, 2008; Baguley, 2010; Shaffer vd., 2012; Saraswathy ve Gong, 2013). MDR, kemotörapatiklerin etki kaybının en belirgin sebebidir ve kanserin yayılmasında önemlidir (Wu vd., 2014). Bağımsız köken alan dirençli hücre hatlarının fenotipik karakteristiği, farklı doku orijinlerine ve seçim için kullanılan ilaçların farklılığına karşın oldukça benzerdir (Fojo vd., 1985; Lemontt vd., 1988). İlaç dirençliliğinde hücre içerisindeki ilaç birikimini kontrol eden mekanizmalar bozulmuş görünmektedir, bu da ilaç alımını sınırlandırır veya ilaç atılımını artırır (Liu vd., 2001).

Kanser hücrelerinde dirençliliği yönlendirmek için çok sayıda mekanizma önerilmiştir. Böyle mekanizmalar ilaç dirençliliği gelişimine katkıda bulunan faktörlere göre selüler olmayan veya selüler tabanlı olarak kategorize edilebilir (Fan vd., 1994). Selüler olmayan mekanizmalar sınırlı vasküler geçiş veya hücre büyüme çevresi gibi ekstraselüler faktörlerle ilgilenirken, selüler mekanizmalar enzim ve taşıma sistemlerini içerir (Ullah, 2008).

Selüler Olmayan MDR Mekanizmaları: Bu mekanizmalar ilaç kullanımının başında kemoterapiye karşı edinilmiş veya doğal direnç gösteren kanserlerin belli tiplerinde normal olarak bulunur. Kanser hücrelerinin normal hücrelerden belirgin şekilde farklı büyüme çevresi, kansere dönüşmede iyi yapılanmış bir damarlanmayla desteklenmesini gerektirir. Fakat belli katı tümörlerde anjiyogenez karışıklığı kötü damarlanmalara yol açar. Bu durum kanser hücrelerine ilacın geçişini engeller bundan dolayı ilaç indüklemeli sitotoksiteyi sınırlar (Jain, 1987). Kanser hücreleri kötü damarlanma nedeniyle besin eksikliği, hipoksi ve laktik asit birikimi sonucu bölünen hücreler üzerinde aktif şekilde hareketi olan veya hücresel alımında pH gradiyenti gereken ilaçlara karşı direnç gösterebilir (Demant vd., 1990).

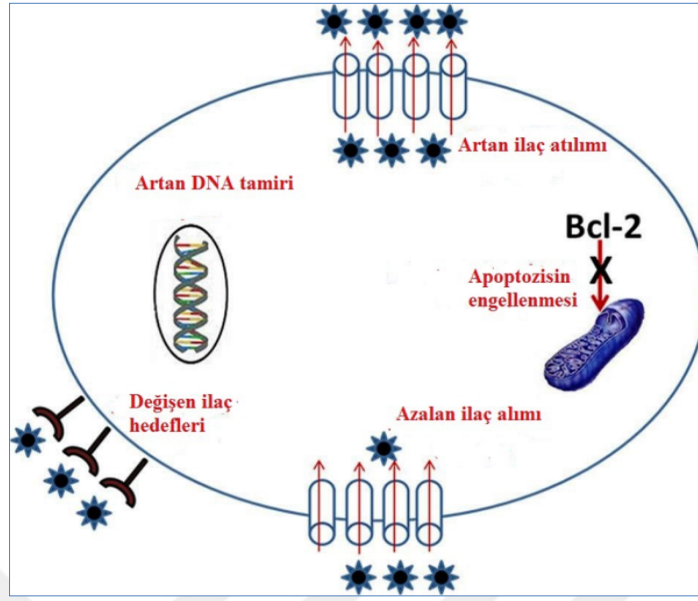
Selüler MDR Mekanizmaları: Selüler MDR mekanizmaları taşıyıcı temelli olmayan veya taşıyıcı temelli mekanizmalar olarak sınıflandırılabilir.

Taşıyıcı temelli olmayan MDR mekanizmaları ilacın hücre içinde etkili konsantrasyonlarını değiştirmeden arzu edilen aktivitesini kısıtlayan enzim sistemleriyle, kısacası detoksifikasyonla ilgilenir. Glutasyon S-transfereaz (GST) ksenobiyotik metabolizmasında önemli bir enzimdir ve organik moleküllerin biyotransformasyonla atılmalarını kolaylaştırmak için polar moleküllerle konjugatlayarak katalizler. GST'nin yüksek ifadesi ilacı azalan aktiviteli son ürüne modifiye eder ve atılma oranlarını artırır (Batist vd., 1986; Hao vd.,1994).

Taşıma temelli selüler MDR mekanizmaları ilacı hücreden çeşitli enerji bağımlı taşıma proteinleriyle atarak hücre içerisinde tōrapatik konsantrasyonlara ulaşmasını sınırlar (Gottesman, 2002). Kemoterapiye cevap vermeyen kanser hastaları genellikle dirençli hücrelerin membranlarının sitoplazmik bölgesine yerleşmiş yüksek derecede ifade edilen çeşitli ABC taşıyıcı proteinlere (ATP Bağlayan Kaset Taşıyıcılar) sahiptir (Shaffer vd., 2012). ABC taşıyıcıları ilaç dirençliliğine aracılık eden, ATP'ye bağımlı olarak çalışan geniş bir protein ailesidir (Leonard vd., 2003).

Kemoterapiye karşı geliştirilen dirençlilik çeşitli mekanizmalarla olabilmektedir (Şekil 2.10.).

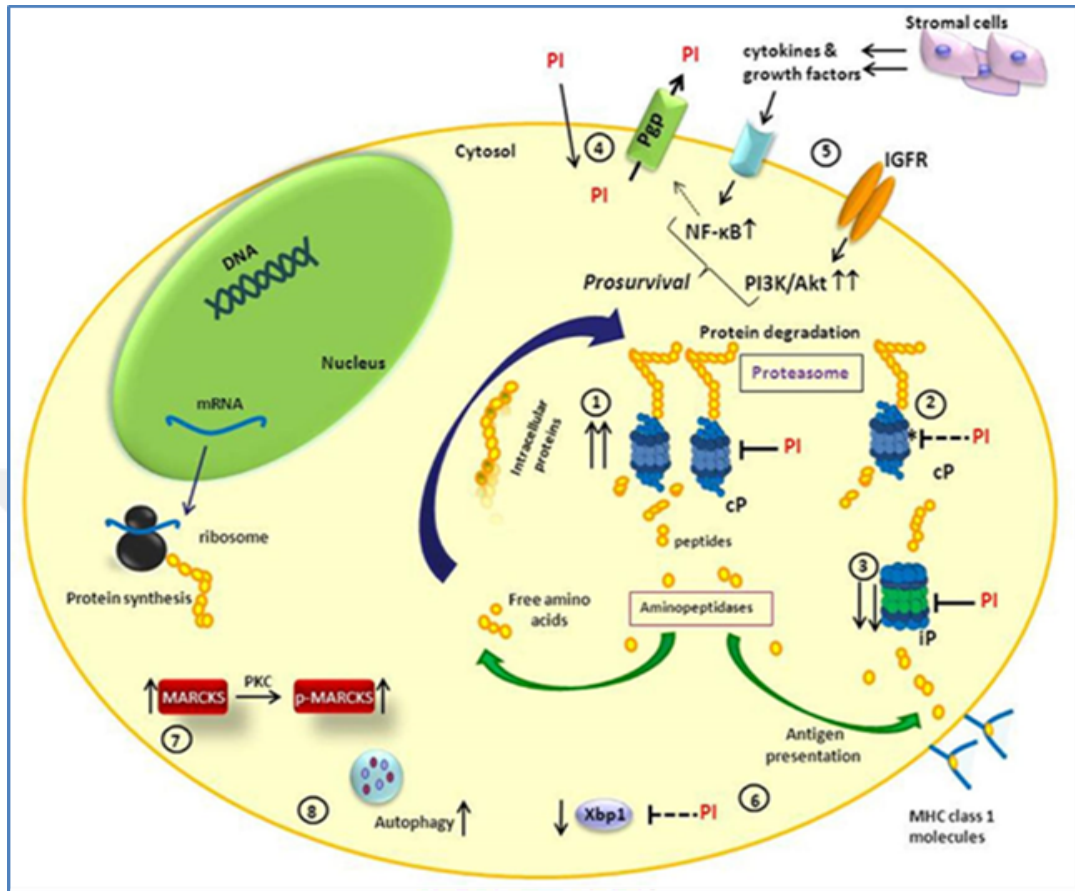
- Artan ilaç atılımı
- Azalan ilaç alımı
- Apoptozisin engellenmesi
- Hücre siklusu düzenleme faktörlerinde değişiklikler
- Sinyal yollarında bozulma
- Detoksifikasyon sistemlerin aktivasyonu
- İlaç biyoaktivasyonunda azalma
- İlaç hedeflerinde meydana gelen değişiklikler
- İlaç kaynaklı DNA hasarının artan tamiri



Şekil 2.10. İlaç dirençliliği mekanizmaları (Kapse-Mistry vd., 2014).

Çoklu ilaç dirençliliği multiple myelomada da sıklıkla gözlenmekte ve hastalığın nüksetmesiyle güçlü bir şekilde ilişkili olduğu düşünülmektedir (Grogan vd., 1993; Sonneveld vd., 1994; Cornelissen vd., 1994). Bortezomib dirençliliği, tedaviyi ilk kez almış yeni teşhis edilen hastalarda bile gözlenmiştir. Bu klinik gözlemler bortezomib dirençliliğinin edinilmiş veya doğal olabileceğini gösterir (Kale ve Moore, 2012; Petrucci vd., 2013; Schmitt vd., 2014). Bu ilaç dirençliliği mekanizmasının altında yatan moleküler temeli araştırmak için yapılan çalışmalar, BTZ dirençli tümör hücre hattı modellerini geliştirmeye yönelmiştir. Hücre temelli çalışmaların sonuçları bortezomib dirençliliğinin ya proteozom seviyesinde ya da daha aşağı yolaklarında gerçekleşebileceğini düşündürmektedir (Şekil 2.11.). Örneğin bortezomib dirençli hücre hatları ve hasta örnekleri, proteozomun $\beta 5$ ünitesinin artan mRNA ve protein ifadesini göstermiştir (Oerlemans vd., 2008; Lü vd., 2008a, 2011). Bortezomib bağlanmasının zayıflamasına sebep olan $\beta 5$ mutasyonları da rapor edilmiştir (Oerlemans vd., 2008; Franke vd., 2012). Ek olarak bazı bortezomib dirençli hücre hatlarında proteozomun aşağı yolaklarında yapısal olarak aktif NF-KB yolağı bulunmuştur (Markovina vd., 2008). Kanser hücrelerinin ilaç dirençliliğinin altında yatan biyolojik ve biyokimyasal mekanizmaları aydınlatmak için birçok araştırma yapılmaktadır. Bunlarla ilgili özellikle anormal ilaç taşınımı, apoptozisin baskılanması, hücre döngüsü ve sinyal yolaklarında

bozulma gibi üç önemli mekanizma üzerine odaklanılmıştır (Şekil 2.11.) (Abdi vd., 2013).

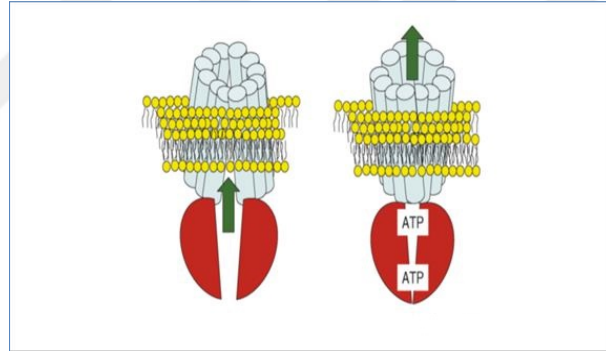


Şekil 2.11. MM hücresindeki ilaç direnci mekanizmaları (Niewerth vd., 2015).

2.4.1 Anormal İlaç Taşınımı

Kemoterapiye karşı geliştirilen dirençlilikte kullanılan kemotörapatik ilaçlar hastalar üzerinde bir süre sonra beklenen etkisini gösteremez ve hastalığın ilerlemesine neden olur. Kullanılan ilaç dozlarının arttırılması ise hastalarda görülen yan etkileri arttırır. Bu nedenle zaman ve ilaç kaybı olur üstelik hastaların tedavisi giderek zorlaşır. Dirençli hücre içerisindeki ilaç birikimini kontrol eden mekanizmalar bozulmuş görünmektedir, bu da ilaç alımını sınırlandırır veya ilaç atılımını arttırır (Liu vd., 2001). Multiple myelomada da MDR fenotipi sıklıkla gözlenmekte, nüksetme ve ilaç direnciyle güçlü bir şekilde ilişkili olduğu düşünülmektedir (Grogan vd., 1993; Sonneveld vd., 1994; Cornelissen vd., 1994).

Kemoterapiye cevap vermeyen kanser hastaları genellikle dirençli hücrelerin membranlarının sitoplazmik bölgesine yerleşmiş yüksek derecede ifade edilen çeşitli ABC taşıyıcı proteinlere sahiptir (Shaffer vd., 2012). ABC taşıyıcı proteinler, üzerinde en fazla araştırma yapılan popüler taşıyıcı ailesidir. ABC taşıyıcıları ATP bağımlı olarak çalışarak MDR'ye aracılık eden protein ailesidir (Leonard vd., 2003). ABC taşıyıcıları, hücre membranında lokalize olan, organizmada özellikle ilaç ve ilaç metabolitlerinin taşınmasından sorumlu proteinlerdir (Şekil 2.12.). Bunların, bağırsak segmentleri, karaciğer, beyin ve böbrek gibi ilaç emilimi, metabolizması, dağılımı ve atılımından sorumlu organlardaki varlığı bilinmektedir (Kara vd., 2013). ABC taşıyıcılarının yüksek ifadesinin MDR'den sorumlu olduğu gösterilmiştir (Choi, 2005). En çok çalışılan MDR proteini hücrelerin plazma membranında yer alan P-gp'nin yüksek ifadesidir (Sonneveld, 2000). Diğer çok çalışılanlar ise MDR ilişkili protein 1 (MRP-1), akciğer kanseri direnç proteini (LRP) ve ABC alt ailesi G üyesi meme kanserine direnç proteini olarak da bilinen (BCRP)'dir (Shukla vd., 2011; Goler-Baron ve Assaraf, 2012).



Şekil 2.12. ABC taşıyıcılarının genel görünümü (Hollenstein vd., 2007).

Hastalığın seyrinde MDR taşıyıcıları, teşhiste zayıf ifade edilmesine rağmen kemoterapiden sonra yüksek ifade edilir. Yeni teşhis edilmiş MM hastalarının %6'sı P-gp pozitifken kemoterapiden sonra %43'ten fazlası P-gp pozitifdir (Grogan vd., 1993). Gen amplifikasyonunda P-gp veya MRP-1 yüksek ifadesi dikkate değer sayıda ilaç dirençli hücre hattında gözlenmiştir (Kuwano vd., 2003). Aslında birkaç MDR modülatörü çoktan MM'in klinik denemelerinde kabul edilmiştir fakat yüksek toksisitesinden dolayı fayda sağlayamamıştır (Dalton vd., 1995; Yang vd., 2003; Friedenber g vd., 2006). Geçmişten bu yana yapılan çalışmaların tümüne rağmen MM'in öncül durumdan nasıl oluştuğunu, etkili terapilerin varlığında bile ilaç

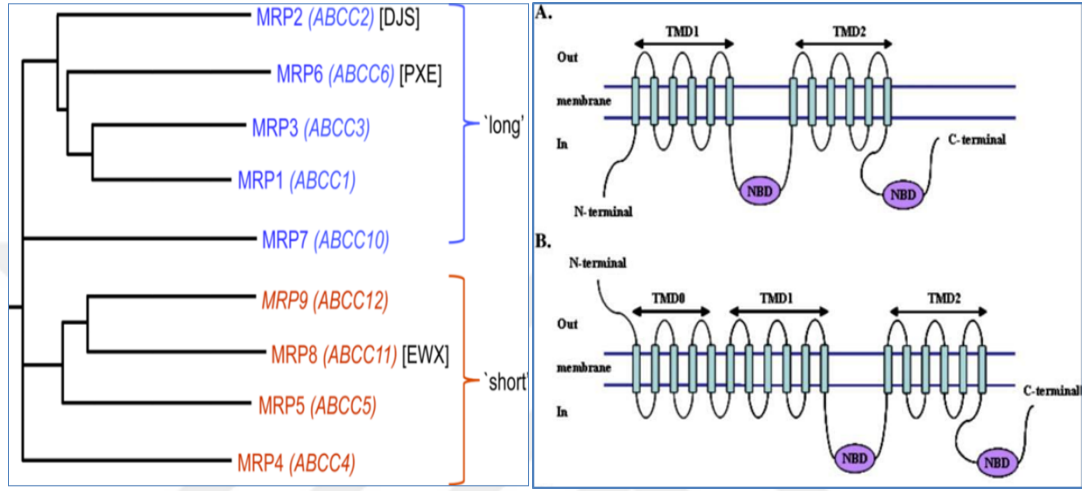
dirençli MM klonlarının nasıl hayatta kaldığını ve neden bazı MM hastalarında nüksettiğini gerçekten hala bilmiyoruz (Abdi vd., 2013).

2.4.1.1 ABC Taşıyıcıları

Çoklu ilaç dirençliliği, ATP-Bağlayan Kaset Taşıyıcılar (ABC) süperailisinin yüksek ifadesi sayesinde farklı kemotörapatik ilaçların atılmasıyla gerçekleşen temel bir mekanizmadır (Fletcher vd., 2010). MDR taşıyıcı proteinleri hücrelerin antikanser ilaçlara karşı savunmasının önemli bir parçasıdır (Borst vd., 2000). Bu ilk kez Danimarkalı doktor Dano tarafından 1973 yılında, ilaç dirençli Ehrlich ascites hücrelerinin hücre içi daunorubicin konsantrasyonunu aktif olarak ilaç atılımıyla azaltabildiğini göstermesiyle açığa çıkmıştır (Dano, 1973). ABC taşıyıcı ailesinin insanlarda bilinen en az 48 üyesi vardır (Gillet ve Efferth, 2007). Bunların tanımlanan 13 tanesinin ilaç taşıyıcısı olduğu varsayılmaktadır (Lage, 2003). Bu taşıyıcılar malign hücrelerde yüksek ifade edilir ve etkili terapi için gerekli antikanser ilaçların hücreden dışarı atılmasını sağlayarak hücre içi ilaç seviyesinin azalmasına neden olurlar. MDR-1 geni tarafından kodlanan P-gp ilk keşfedilen dışa atım pompasıdır (Juliano ve Ling, 1976). Diğer membran taşıyıcı MDR ilişkili proteinler MRP-1 (Cole vd., 1992a) ve MRP-2 (Ishikawa vd., 1990), MRP-3, MRP-4, MRP-5, MRP-6, MRP-7, MRP-8, MRP-9'dur.

ABC taşıyıcıları çok önemli fonksiyonlarıyla bitkileri, deniz canlılarını, tek hücreli ökaryotları içeren tüm doğada evrimsel olarak korunmuştur ve bunların arasında şekilsel, fonksiyonel benzerlikler bulunmaktadır. ABC taşıyıcıları, sitoplazmik ATP bağlanma ve helikal membran geçen alanlar içeren karakteristik alanların kombinasyonundan yapılmış geniş membran bağlı proteinlerdir. İnsan genomunda kodlanan ABC proteinlerinin sekans sıralamaları, bu proteinlerin yedi alt aileye (A'dan G'ye) gruplanabileceğini açığa çıkarmıştır (Şekil 2.13.). Alt aile 'C' 12 proteinden oluşmakta ve MRP (ABCC) olarak adlandırılan dokuz ilaç taşıyıcı içermektedir (Dean ve Allikmets, 2001). Diğer üçü ise kistik fibrozis transmembran kondüktans düzenleyici (CFTR/ABCC7) proteini ve sülfonilüre reseptörleridir (SUR1/ABCC8 ve SUR2/ABCC9). Dokuz MRP proteinlerinin dördü kısa MRP'ler olarak bilinir, (MRP-4, MRP-5, MRP-8, MRP-9) tipik ABC yapısıyla dört kısım TMD (transmembran alan) olarak da bilinen iki MSD'den (membran geçen alan) oluşur ve her birinde bir NBD (nükleotid bağlanan alan) bulunur (Şekil 2.13.). Aynı

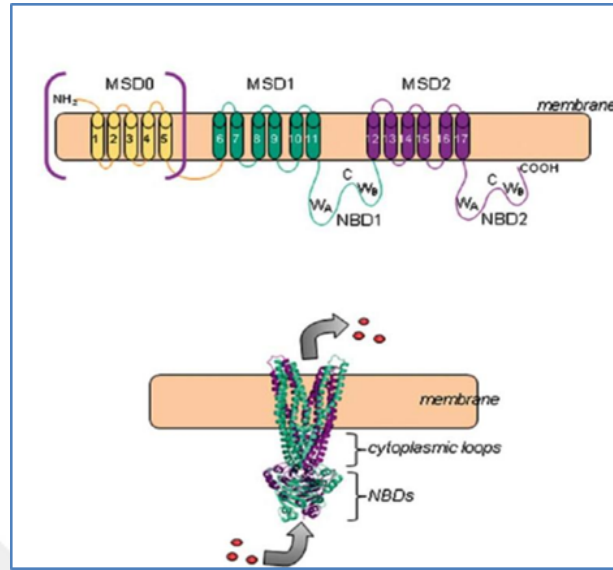
zamanda alt aile 'B'nin üyesi olan ABCB1 gen ürünü P-gp de bu yapıya sahiptir. Uzun MRP'ler olarak bilinen (MRP-1, MRP-2, MRP-3, MRP-6, MRP-7) N-ucunda bulunan ekstra alan MSD0 ile beş kısma sahiptir (Şekil 2.13.). Bazı araştırmacılar MRP-1'deki bu kısmın taşıma aktivitesi için gerekli olmadığını göstermiş ve gerekli olduğu düşünülen L0 kısmı zaten MRP-4 ve MRP-5'de hücre içi uzun N-uç kısımlarında korunmuştur (Gao vd., 1996; Bakos vd., 1998).



Şekil 2.13. MRP ailesi (Chen ve Tiwari, 2011) ve yapısı (Gillet vd., 2007).

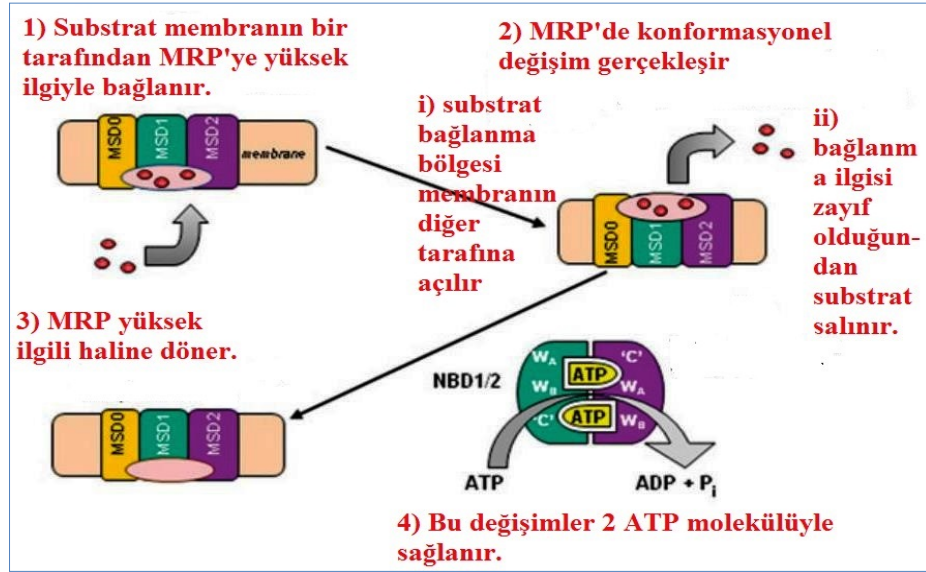
ABC taşıyıcılarının transmembran alanları, altı transmembran geçen heliksten oluşur ve taşınan substratlarla etkileşen bölgeler burada yerleşmiştir. Yüksek ilgiyle açık bölgelere bağlanan ve düşük ilgide kapalı bölgelere yüklenmeyen substratlarla kompleks reaksiyon sağlanması için 12 membran geçen heliks gereklidir. ABC taşıyıcıları ATP hidrolizleyici nükleotid bağlanma alanlarında da benzer düzenlemeler ortaya koyar. İki NBD proteini baştan uca uyumlu olan 'sandviç dimeri modeli'ni oluşturmak için iki karma nükleotid bağlanma bölgesi (NBS) içerir (Hollenstein vd., 2007; Linton ve Higgins, 2007). NBS'ler yüksek derecede korunmuş Walker A ve Walker B motiflerinden oluşur (Şekil 2.14.). Sitoplazmik nükleotid bağlanma alanlarının ATP ile yönetilen sıkı dimerizasyonu ve NBD dimer arayüzünün eş zamanlı olarak dinamik yeniden yapılanması TMD'lerdeki konformasyonel değişimlerle sağlanır (Vergani vd., 2005). Şu anki modeller ATP'nin bağlanmasıyla TMD'lerin dışa bakan bir konformasyonunu ve hidroliz ürünlerinin ayrışmasıyla 12 transmembran heliksinin içe bakan bir konformasyonunu yöneten ortak bir erişim ve salınma mekanizmasını önerir (Şekil 2.14.) (Hollenstein

vd., 2007). Bu basit mekanizma ile ABC taşıyıcılarının ilaç atımı açıklanabilir (Zolnericiks vd., 2007; Hollenstein vd., 2007).



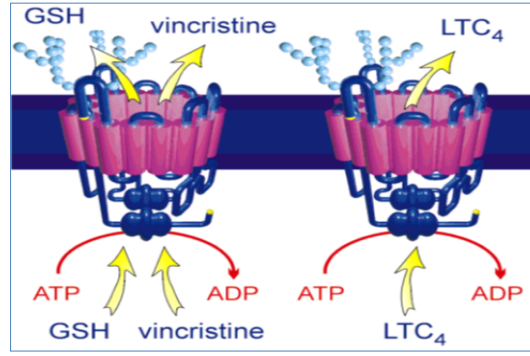
Şekil 2.14. ABC taşıyıcılarının üç boyutlu yapısı (Slot vd., 2011).

Tüm memeli ABC proteinlerindeki gibi MRP'lerin substrat translokasyonu da substrat tanınmasıyla başlar, membranın bir tarafındaki substratı yüksek ilgiyle bağlar, membrandan translokasyonunu sağlayan konformasyonel değişiklikler geçirir ve membranın zıt tarafına substratı bırakır (Şekil 2.15.). Taşıyıcı bir kez yüksek ilgi konformasyonunu üstlendiğinde taşımanın diğer bir aşaması başlar. Bu işlemler zorunlu olarak ATP bağlanma ve hidroliziyle eşlendiği kadar ADP/Pi salımıyla da eşlenir (Linton ve Higgins, 2007). Çok sayı ve çeşitteki moleküller MRP tarafından membrandan taşınır. Bazı MRP'lerin substrat özgüllüğünü paylaşması sınırlıdır, fakat taşınma kinetiğindeki farklılıklar genellikle önemlidir. MRP'lerin doku dağılımında ve polarize epitel ve endotelial hücrelerde membran lokalizasyonu da önemli farklılıklar gösterir. Bu farklılıklar birlikte her bir MRP taşıyıcısının eşsiz farmakolojik ve fizyolojik fonksiyonlarından sorumludur.



Şekil 2.15. ABC taşıyıcılarının substrat taşıma mekanizması (Slot vd., 2011).

İlaçların çoğu doğal toksinlerdir ve onkologlar tarafından hücrelere pasif difüzyonla giriş için kullanılır. Bu amfipatik ilaçlar çift tabakalı lipiddan diffüzlenebileceği kadar hidrofobik, fakat suda çözünebilecek ve hedeflerine ulaşabilecek kadar hidrofiliktir (Regev ve Eytan, 1997). Birkez içeri girdiğinde bu amfipatik ilaçlar oksidasyon veya konjugasyonla inaktif olabilir. Kendi kendine konjugasyon, ilaçtan kurtulmak için yeterli değildir (Ishikawa, 1992). Konjugasyonlu ilaç GSH'nı ona yapıştığı ve pasif difüzyonla hücreden ayrılmadığı için artık daha hidrofiliktir. İlaç hücreye girdikten sonra, bir GS-X (glutatyon-S-konjugat) pompası olan özel dışa atım pompalarıyla atılana kadar GSH konjugatı aşırı konsantrasyonlarda birikecektir (Şekil 2.16.). Bu GS-X pompaları ABC taşıyıcılarıdır ve son yıllarda klinik olarak ilişkili ilaçların doku dağılımı ve eliminasyonun da önemli olduğu gösterilmiştir. Bu sayede ABC taşıyıcıları tıroapatik ve diagnostik ajanların çoğunun etkinlik ve toksisitesine katkıda bulunur. ABC taşıyıcıları aynı zamanda sinyal yollarındaki önemli rolleriyle de geniş bir orandaki fizyolojik metabolitlerin hücresel atımına da aracılık eder (Slot vd., 2011).



Şekil 2.16. ABC taşıyıcılarıyla ilaçların taşınması (Cole ve Deeley, 1998).

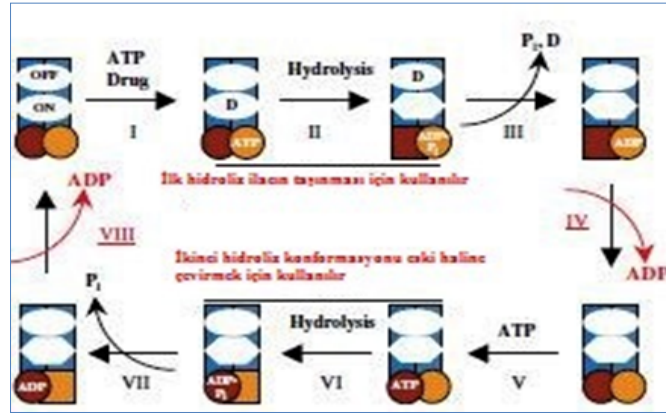
Bir ilacın ABC taşıyıcıları için substrat veya inhibitör olarak karakterizasyonunda doz rejimlerinin seçimi, toksik etkileri tahmin etme ve potansiyel ilaç-ilaç etkileşimleri gibi önemli etkenleri göz önünde bulundurmak gerekir. Bu yüzden ABC taşıyıcıların farmakolojik ilgisi, ilaç-taşıyıcı veya ilaç-ilaç etkileşimlerini test etmek için in vitro sistemler kurulmuştur. Genellikle in vitro denemeler ABC taşıyıcılarını yüksek ifade eden hücreleri veya bu hücrelerden izole edilen membranları kullanır. Araştırılan substratın doğrudan takip edildiği denemeler de vardır. Fakat taşınan ilaç hidrofobik olduğundan onların birikimi ve salgılanması hücre içi (veya vezikül içi) bağlanma bölgelerine ulaşılabilirliğine olduğu kadar hücre membranının geçirgenliğine de bağlıdır. Bu nedenle ilaç taşınmasını karakterize etmek için çok fazla yöntem (ilaç uyarımlı ATPaz aktivitesi, flöresan boya taşınması, vs.) geliştirilmiştir. Tüm bunlara rağmen ABC taşıyıcıları için substrat ve inhibitörleri ayırmanın her zaman basit olmadığını bu taşıyıcıları tek tek incelediğimizde daha iyi anlayacağız.

P-gp (MDR-1)

ABC taşıyıcı ailesinin ilk keşfedilen üyesi olan P-glikoprotein (P-gp), ATP hidrolizine bağımlı olarak çalışan ve dışa atım pompası işlevi gören bir membran proteinidir. ABC ailesinin B alt ailesine ait olan P-gp, insanlarda 7. (7q21.1) kromozomunda yer alan MDR-1 geni tarafından kodlanmaktadır ve klonlanan ilk ABC taşıyıcısıdır. P-gp, 1280 aminoasitin birleşmesinden oluşur ve molekül ağırlığı 170 kDa'dır. Molekül, altışar transmembranal segment içeren iki transmembranal alan ve iki nükleotid bağlayıcı alandan oluşmaktadır (Schinkel ve Jonker, 2003; Padowski ve Pollack, 2010). MDR-1 geni (GenBank erişim no: AF016535) ürünü P-gp en çok çalışılan ABC proteinlerinden biridir (Gottesman vd., 2002).

P-gp, ilk defa 1976 yılında Juliano ve Ling tarafından, kolçisine dirençli Çin hamsteri yumurtalık hücrelerinde aşırı ifade edilen bir yüzey glikoproteini olarak tanımlanmıştır (Juliano ve Ling, 1976). P-gp birincil aktif ilaç taşıyıcı proteindir, ilacı bağlayarak ATP hidroliziyle konsantrasyon gradiyentine karşı taşır (Germann, 1996; Borst ve Schinkel, 1997). P-gp, antikanser ilaçları ve diğer hidrofobik bileşikleri aktif şekilde hücre dışına taşıyan enerji bağımlı plazma membran atım pompası olarak fonksiyon görür. P-gp'nin fizyolojik fonksiyonu detoksifikasyon ve ksenobiyotiklerle ilgili olduğu kadar, hormonların salgılanmasıyla da ilgili olabilir.

Gerçekleştirilen immünohistokimyasal analizler P-gp'nin sağlıklı insan dokularında büyük ölçüde ifade edildiğini göstermiştir. P-gp epitelyal hücrelerde (gastrointestinal sistem, karaciğer ve böbrek) ve kılcallarda (beyin, testis, yumurtalıklar ve adrenal bezler) ksenobiyotiklerin alımında bariyer gibi hareket eder. P-gp, ilaç ve diğer ksenobiyotikleri vücuttan uzaklaştırarak doğal bir savunma mekanizması işlevi görmektedir. P-gp'nin anatomik lokalizasyonu ve dışa atım fonksiyonu göz önüne alındığında ilaçların Emilimi, dağılımı ve eliminasyonunda önemli rol oynadığı görülmektedir (Lin ve Yamazaki, 2003; Fromm, 2004; Marchetti vd., 2007; Padowski ve Pollack, 2010). P-gp'nin üç boyutlu yapısının analizi, P-gp substratlarının tipik olarak hidrojen bağı yapabilen gruplar içerdiğini açığa çıkarmıştır (Zheleznova vd., 2000; Seelig ve Landwojtowicz, 2000). P-gp substratlarının hücre içine serbestçe difüze olması beklenir ve P-gp onları plazma membranına girmeden de tanıyabilir (Stein, 1997; Litman vd., 2003). P-gp farklı ilaçlarla farklı etkileşimler yaparak böylece her bağlanma cebinde 'indüklemeli-uyum mekanizması'yla benzersiz bir şekilde çalışıyor görünmektedir (Şekil 2.17.) (Pawagi vd., 1994; Loo vd., 2003; Pajeva vd., 2004). Son derece geniş bir substrat spesifitesine sahip olan P-gp, antineoplastik ilaçlar, immünosüpresanlar, steroid hormonlar, kalsiyum kanal blokerleri, β -blokerler ve kardiyak glikozidler, antibiyotikler, antidepresanlar, antiepileptikler, antihiperlipidemik ilaçlar, H1 ve H2 reseptör blokerleri, HIV proteaz inhibitörleri gibi kimyasal yapı ve farmakolojik olarak farklı, çok sayıda hidrofobik ilacı taşıyabilmektedir (Takano vd., 2006; Stavrovskaya ve Stromskaya, 2008; Zhou, 2008).



Şekil 2.17. P-gp'nin ilaç taşıma mekanizması (Ambudkar vd., 2003).

Kanser hastalarına uygulanan kemoterapinin başarısız olmasının temel nedenlerinden biri P-gp aracılığı ile gelişen MDR'dir (Lee, 2010). P-gp kanser hücrelerinde normalden fazla ifade edilerek, yapısal olarak farklı pek çok ilacın hücre içerisine alınmasını engellemek ve bunları tümör hücrelerinden dışarı atmak suretiyle intraselüler ilaç konsantrasyonlarının azalmasına neden olmaktadır (Vaalburg vd., 2005; Stavrovskaya ve Stromskaya, 2008; Yuan vd., 2008; Lee, 2010). P-gp, antrasiklinler, epidofilotoksinler, vinka alkaloidler, taxanlar gibi antikanser ilaçlara direnç gösterir. Şu an rutin olarak kullanılan antikanser ajanlarının çoğu P-gp'nin substratı olduğundan P-gp'yi yüksek ifade eden kanser hücreleri tedaviye direnç geliştirebilmektedir. Kemoterapiye doğuştan dirençli kanserler (böbrek, adrenokortikoid, hepatoselüler, pankreatik ve kolorektal) sıklıkla P-gp'yi yüksek ifade eder. Edinilmiş dirençli kanserlerde daha önce az veya hiç P-gp ifadesi olmayanlar (AML, göğüs kanseri ve küçük hücreli akciğer kanseri) kemoterapiden sonra yüksek ifade seviyeleri gösterirler.

Kanser hücrelerinde P-gp inhibitörlerinin sitotoksik ajanlarla birlikte uygulanmasının MDR'yi geri çevirmesi ve tedavi çıktılarına iyileştirmesi beklenir. P-gp'yi yüksek ifade eden hücreler tutarlı olarak bu ilaçlara P-gp inhibitörleriyle geri çevrilebilen direnç gösterirler (Verbrugge vd., 2012). En yaygın kullanılan P-gp inhibitörleri Verapamil, PSC833 ve Tariquidar'dır. Birinci ve ikinci nesil inhibitörleri kullanan çalışmaların sonuçları P-gp modülasyonunun yararından şüphe duyulmasına neden olmuştur. Çeşitli nesil P-gp inhibitörleri klinik denemelerde başarısızlığa uğramış olup bu negatif sonuçlar inhibitörlerin doğuştan toksisitesine ve denemelerin yetersiz dizaynıyla açıklanabilir (Szakács vd., 2006). Kanser hücrelerinde P-gp'nin

modülasyonunun zor olmasından dolayı MDR'yi önleme girişimleri eş zamanlı olarak uygulanan ilaçların ilaç-ilâç etkileşimleri, tekrar P-gp ifadesiyle sonuçlanarak bir paradoksa sebep olur.

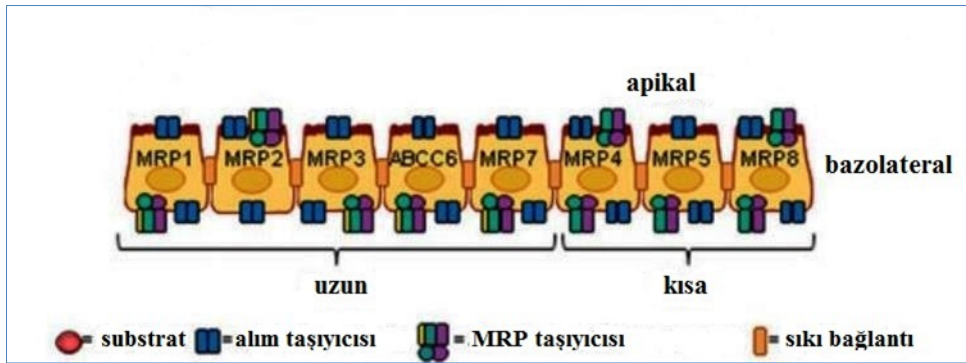
MM hastalarında yaygın olarak kullanılan BTZ sonrası genellikle P-gp ifadesi artarken (Grogan vd., 1993), bazı çalışmalar BTZ'in P-gp için zayıf bir substrat olduğunu belirtir (Minderman vd., 2007; Oerlemans vd., 2008; Wiberg vd., 2009; Verbrugge vd., 2012). Bunun yanında başka çalışmalar da MM hücrelerinde BTZ'in P-gp ifadesini düşürebildiğini göstermiştir (O'Connor vd., 2013). P-gp geninin nakavt edilmesi, P-gp'yi yüksek ifade eden hücre hatlarını proteozom inhibitörlerine karşı hassaslaştırdığı rapor edilmiştir (Rumpold vd., 2007). P-gp nakavtlı hayvanlardaki P-gp substratlarının doku dağılımı üzerine derin bir etkisi vardır. Fare iki Mdr-1 genine sahip olduğundan (insan MDR-1 geniyle eşleşen) P-gp'nin in vivo ilâç dağılımına katkısı yalnızca Mdr-1a/1b çifte nakavtlı farede tam olarak anlaşılabilir (Schinkel vd., 1994). Şaşırtıcı şekilde nakavtlar canlı ve doğurgandır. P-gp nakavtlı farenin canlı ve doğurgan olması dirençli kanserleri önlemek için güvenli ve etkili bir strateji olarak insan P-gp'sinin farmakolojik modülasyonunu önerir.

MRP-1

MRP-1 geni ilk kez ilâç dirençli akciğer kanseri hücre hattından klonlanmıştır ve 16. (16p13.1) kromozomda yer alır (Cole vd., 1992a). MRP-1, MRP ailesinin ilk üyesi olup 190 kDa ağırlığında plazma membranına yerleşmiş bir proteindir (Filipits, 2004). 1531 aminoasit içererek çeşitli organ ve hücre tiplerinde ifade edilir. MRP-1 geni (GenBank erişim no: L05628) ürünü proteinin ve P-gp'nin hidropati profilleri - COOH uçlarından sıralandığında çok benzer olmasına rağmen, iki protein arasındaki aminoasit benzerliği çok düşük (%15) ve sadece korunmuş NBD'lerle sınırlıdır (Cole vd., 1992a). MRP-1 proteini tüm organlarda fakat belli dokularda (testis ve akciğer) nispeten yüksek seviyelerde bulunur. MRP-1'in doku dağılımı bir dizi kan-organ ara yüzlerinde belli sitotoksik ilâçların penetrasyonunu sınırlaması rolüyle tutarlıdır ve böylece vücutta kan-beyin bariyeri ve kan testis bariyeri gibi farmakolojik olarak ulaşılması zor bölgeler oluşumunu sağlar (Leslie vd., 2005). Doku korunmasında MRP-1'in rolüne direkt kanıt MRP-1 geni nakavtlı fare çalışmalarından gelir. Bu nakavt fare canlı ve doğurgan olmasına rağmen seminifer tübülleri, bağırsak, orofaringeal mukoza ve koroid pleksus gibi belli dokularda artan kemosenzitivite

gösterir (Wijnholds vd., 1997, 1998, 2000b; Lorico vd., 1997). MRP-1 fizyolojik olarak belli dokuları toksik ajanların etkisinden koruyarak aynı zamanda inflamasyon, dendritik hücre fonksiyonu ve folat homeostasisinde rol oynayabilmektedir.

MRP-1'in substrat özgüllüğü için, MRP-1'i yüksek ifade eden hücrelerden hazırlanmış membran vezikülleri kullanılarak bileşiğin radyoaktif işaretli formunun ATP bağımlı alımını ölçen in vitro çalışmalarla çeşitli bileşikler tanımlanmıştır (Leier vd., 1994). Polarize hücreler (bağırsak, böbrek ve karaciğer) ilaç dağılımı ve kan-doku bariyerlerine sınırlı dağılımla ilgilidir. Böyle polarize hücreler sıkı bağlantıyla ayrılmış apikal ve bazolateral membranlara sahiptir. İlaç taşıyıcıları bu iki membrana asimetric yerleşme eğilimindedir ve ilaç veya metabolitin hücrenin apikalden bazolateral tarafına (veya tersi) transselüler (vektöriyel) taşımaya kolaylaştırır (Şekil 2.18.). Böylece bazolateral membranlarında bir veya daha fazla alım taşıyıcıları ve apikal membranlarında atım taşıyıcıları ifade eden ikili ve çoklu transfekteli polarize hücre hatları yetiştirilmiştir (Nies vd., 2008; Hirouchi vd., 2009). Böyle hücre hatları karaciğer ve böbrekte ilaç taşıması deneylerinde model olarak kullanılmada büyük kolaylık sağlar.



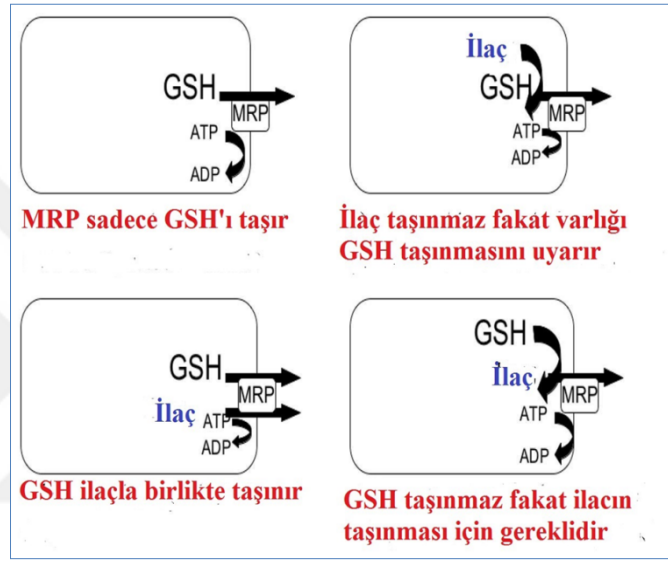
Şekil 2.18. ABC taşıyıcılarının hücre membranlarındaki yerleşimi (Slot vd., 2011).

MRP-1'in fizyolojik fonksiyonuyla ilgili ilk işaretler glutatyon (GSH, γ -Glu-Cys-Gly) konjugeli araşidonik asit türevi LTC₄'ün etkili bir taşıyıcısı olduğunu gösteren in vitro deneyden sağlanmıştır (Leier vd., 1994). LTC₄, astım ve alerjik reaksiyonlarla olduğu kadar kas daralması ve vazokonstriksiyonla ilişkili proinflamatuvar bir araşidonik asit türevidir (Samuelsson vd., 1987). LTC₄'ün MRP-1'in fizyolojik bir fonksiyonuyla ihraç edildiğinin kabulüne ilişkin in vivo kanıtlar,

MRP-1 nakavtlı farenin LTC₄ atımıyla ilişkili azalan inflamatuvar cevaplar göstermesi gözleminden sağlanmıştır (Wijnholds vd., 1997). LTC₄'e ek olarak MRP-1 yapısal olarak farklı çeşitteki diğer GSH-konjugeli organik anyonları da taşır (Jedlitschky vd., 1994, 1996; Leier vd., 1994; Muller vd., 1994). Bunlardan bazıları endojen metabolitlerdir ve diğerleri glutatyona konjuge olmuş ilaçlar, glukoronat veya sülfat gibi faz 2 ksenobiyotik metabolizmasının ürünleridir (Hipfner vd., 1999; König vd., 1999a; Leslie vd., 2005; Cole ve Deeley, 2006). Aslında MRP-1, yakalanması zor olan GSH'a konjuge olmuş ilaçları hücre dışına taşıyabilen glutatyon-S-konjugat (GS-X) pompaları grubundan olan bir taşıyıcıdır (Ishikawa, 1992).

MRP-1 proteini hasta tümör örneklerinde sıklıkla tespit edilmesine rağmen bu taşıyıcının klinik ilaç direncine tam katkısı hala iyi tanımlanmamıştır (Deeley vd., 2006). Hücrelerde MRP'lerin yüksek ifadesi direnç gelişimine katkıda bulunur. MRP-1'in lösemiler, özofagiyal karsinomlar ve küçük olmayan hücreli akciğer kanserinde yüksek ifade olduğu rapor edilmiştir (Nooter vd., 1995). Bunun yanında MRP-1 belli antrasiklinlere, vinka alkaloidlere ve epidofilotoksinlere direnç gösterir (Xia vd., 2013). GSH, dirençlilik için gereklidir ve hücreSEL GSH açlığı vinka alkaloid ve atrasiklinlere karşı MRP-1 aracılı direnci ortadan kaldırır (Versantvoort vd., 1995; Zaman vd., 1995). Veziküler taşıma deneyleri sayesinde vincristine veya daunorubicin taşınmasının yalnızca azalan GSH varlığında gerçekleştiği gösterilmiştir (Loe vd., 1996c; Rappa vd., 1997; Loe vd., 1998; Renes vd., 1999). MRP-1, GSH'la çok sayıda kompleks etkileşime sahiptir (Cole ve Deeley, 2006). Bu selüler tripeptid, antioksidan olarak oksidatif stresin yok edici etkisinden hücreleri korur. MRP-1 nakavtlı faredeki bazı dokuların GSH seviyelerinin iki kat artması GSH'ın MRP-1 substratı da olduğuna in vivo kanıt olarak değerlendirilir (Lorico vd., 1997). MRP-1 aracılı GSH taşınımı ksenobiyotiklerin oranlarıyla uyarılabilirken (Loe vd., 2000; Leslie vd., 2003) vincristine taşınımını da GSH uyarır (Loe vd., 1996c; Mao vd., 2000). Böylelikle bu durumda GSH ilaçla birlikte taşınıyor (veya taşınımını karşılıklı uyarıyor) görünmektedir (Şekil 2.19.). GSH'ın biyolojik aktiviteleri tipik olarak tiyol grubunun (-SH) merkezi sistein parçalarından proton verme özelliklerine atfedilir. MRP-1 aktivitesi üzerine olan uyarıcı etkisinde bu durum geçerli değildir. MRP-1'le ilaç taşınımı, Cys parçasının Leu gibi bir aminoasitle veya kısa zincirli modifiye olmuş alkil parçasıyla (S-methyl GSH) yer

değiştirmiş azalmayan tripeptidlerle de uyarılabilir (Loe vd., 1996c; Leslie vd., 2003). GSH, MRP-1'in konformasyonunda değişikliklere sebep olabilir fakat bu değişikliklerin nasıl taşıma uyarıcı aktivitesiyle ilişkili olduğu bilinmemektedir (Rothnie vd., 2006). Bu kritik sülfhidrilleri (-SH) taşıma yeteneğiyle tutarlı olarak biriken kanıtlar MRP-1'in hücrel oksidatif stres ve redoks homeostasisinde önemli bir modölatör rol oynadığını gösterir (Krause vd., 2007). Diğer çalışmalar GSH atımının hücre hasarı cevabında MRP-1 aracılı apoptotik sinyalin bir parçası olduğunu da göstermiştir (Marchan vd., 2008).



Şekil 2.19. MRP taşıyıcılarıyla GSH etkileşiminin dört muhtemel mekanizması (Ballatori vd., 2009).

MRP-1'in substrat özgüllüğü için önemli olan aminoasitler sıklıkla membrandan translokasyon yolunu oluşturan membran geçen domain 1 ve 2'de yerleşmiştir. Bu fonksiyonel olarak önemli aminoasitlerin çoğu bölgeye yönlendirilmiş mutagenез çalışmalarıyla tanımlanmıştır (Deeley ve Cole, 2006; Iram ve Cole, 2011; Slot vd., 2011). Her substrat MRP-1'in substrat bağlanma cebinde kendi benzersiz bağlarını kurmaktadır. BTZ ve epoksi keton bazlı proteozom inhibitörlerini MRP-1-5'in taşımadığı rapor edilmiştir (Verbrugge vd., 2012). MRP inhibitörü MK571'in çeşitli taşıma deneylerinde MRP-1 aracılı taşımayı submikromolar konsantrasyonlarda yarışmalı olarak engelleyebildiği gösterilmiştir (Jedlitschky vd., 1994, 1996; Leier vd., 1994, 1996). Fizyolojik metabolitleri önemli oranda taşıma yeteneğine karşın MRP-1 eksikliği ile ilişkili herhangi bir insan hastalığı bilinmemektedir.

MRP-2

MRP ailesinin iki numarası MRP-2 (GenBank erişim no: U49248), 10. (10q24) kromozomunda bulunmaktadır ve kanaliküler organik anyon taşıyıcısı (cMOAT) olarak da bilinir (Paulusma vd., 1996). MRP-2'nin biyokimyasal karakterizasyonu, 1990'da Ishikawa ve arkadaşlarının hepatositlerin kanaliküler membranında glutatyon-S-konjugatlarını taşıyabilen, ATP-bağımlı bir taşıyıcı proteini bulmaları ile başlamıştır (Ishikawa vd., 1990). 1996 yılında insan ve sıçan MRP-2 geninin klonlanması ile de MRP-2'nin yapısı aydınlatılmıştır (Borst vd., 2006). MRP-2, karaciğer ve böbrekteki lokalizasyonunun yanı sıra ince bağırsak, kolon, safra kesesi, bronşlar ve plasentanın epitel hücrelerinin apikal membranlarında da eksprese olmaktadır (Schaub vd., 1997; Nies ve Keppler, 2007). MRP-2 proteini ve P-gp arasındaki aminoasit sekans benzerliği %25 iken, MRP-2 ve MRP-1 %49 aminoasit benzerliğini paylaşır (Keppler ve König, 1997).

MRP-1'de bahsedildiği gibi MRP-2'nin substrat özgüllüğüyle ilgili bilgiler de veziküler taşıma deneylerinden gelmiştir. MRP-2'nin mutasyonel analizleri MSD1 ve MSD2 alanlarındaki yüklü aminoasitlerin, substrat belirleyiciliğinde önemli bir rolüne işaret eder (Ryu vd., 2000). MRP-2 birçok organik anyonun, endojen bileşiklerin, ksenotoksinlerin ve bunların glukronat, sülfat ve glutatyon konjugatlarının hücre dışına taşınmasına aracılık etmektedir (Keppler ve König, 1997; Kusuhara ve Sugiyama, 2002). Ek olarak MRP-2, LTC₄ ve konjugeli bilirubinler gibi belli endojen konjugatların safra eliminasyonundan da sorumludur (Kawabe vd., 1999; Nies ve Keppler, 2007). MRP-1 ve MRP-2 taşıyıcılarının östradiol glukoronidleri taşıma kinetikleri birbirinden farklıdır (Zelcer vd., 2003). MRP-2'nin MRP-1'le benzer büyüklük ve topolojide olmasına rağmen, MSD0'ı MSD1'e bağlayan sitoplazmik bölgede taşıyıcının C-ucunda, plazma membran trafiği ve hücredeki diğer proteinlerle fonksiyonel etkileşimlere katıldığı, proteine farklı özellikler sunan ek sekans motifleri vardır (Bandler vd., 2008). Bundan dolayı MRP-2, iki benzer fakat eşit olmayan ligand bağlanma bölgesi içeriyor görünmektedir; substratın taşındığı bir bölge ve substratın taşınma bölgesinin ilgisini düzenleyen ikinci bölge (allosterik). Östradiol glukoronid iki bölgeyede bağlanıyor görünmektedir fakat bu MRP-2'ye bağlanan tüm ligandlar için geçerli değildir.

MRP-2'nin fizyolojik rolü sağlıklı ve gözlenebilen fenotipik bir anormalliği bulunmayan MRP-2 nakavtlı fare kullanılarak kabul edilmiştir (Chu vd., 2006).

MRP-2 eksikliğinde Dubin-Johnson sendromu olarak adlandırılan karaciğerde kahverengi pigmentlerin çökmesi sonucu kronik konjugeli hiperbilirubinemi ile karakterize olan kalıtsal, otozomal resesif bir hastalık görülür (Dubin ve Johnson, 1954; Kartenbeck vd., 1996; Paulusma vd., 1997; Hirohashi vd., 1998). İnsan MRP-2 fonksiyonunun bozulmasıyla sonuçlanan mutasyonlar 1990'ların sonlarından beri tanımlanmaktadır. Hem anlamsız hem de yanlış mutasyonlar tanımlanmış ve bunların sonucundaki çoğu durum proteinin azalan seviyeleri ve yokluğuyla sonuçlanmıştır (Lee vd., 2006; Kanda vd., 2009). Sonuç olarak Dubin-Johnson sendromlu bireylerde bilirubin konjugeli artan serum seviyeleri, sıklıkla bilirubin glukoronidin safra eliminasyonu ile tutarlı şekilde bozulmuştur (Nies ve Keppler, 2007).

MRP-2, insanda normal dokulardaki ifadesinin yanı sıra tümör hücrelerinde de ifade olmaktadır. MRP-2 böbrek, kolon, göğüs, akciğer, yumurtalıktan köken alan bazı katı tümörlerde olduğu kadar, AML'li hastalardan alınan hücrelerde (van der Kolk vd., 1998; Sandusky vd., 2002) ve akciğer, mide, böbrek, kolorektal tümör hücre hatlarında da ifade edilir (Narasaki vd., 1997). İn vitro çalışmalar MRP-2'nin methotrexate, cisplatin, irinotecan, paclitaxel ve vincristine gibi çeşitli antikanser ilaçlarını taşıyabildiğini rapor etmiştir (Chu vd., 1997; Cui vd., 1999; Huisman vd., 2005). MRP-1'den farklı olarak MRP-2, platinyum içeren ilaçlara da direnç sunabilir (Koike vd., 1997; Leslie vd., 2005; Deeley vd., 2006; Nies ve Keppler, 2007) ve MRP-2 ifadesinin hepatoselüler karsinomlu hastalarda cisplatin temelli kemoterapinin etkisini belirlediğini rapor edilmiştir (Korita vd., 2010). Artan MRP-2 mRNA seviyeleri bazı cisplatin ve doxorubicin dirençli hücre hatlarında da rapor edilmiştir (Taniguchi vd., 1996; Kool vd., 1997). MRP-2 ile transfekte edilmiş polarize böbrek hücrelerinde vinblastine'in artan taşınımı sitokiyometrik olarak artan GSH atımı ile ilişkili olup bundan dolayı MRP-2 aracılı ilaç dirençliliği konjuge olmamış ilacın dışa atımına izin vermek için sürekli GSH gerektirmektedir (Ishikawa vd., 1996; Kuo vd., 1998). MRP-2'nin birçok antikanser ilaca karşı direnç oluşturduğu göz önüne alındığında, insan tümör hücrelerindeki ifadesi klinik açıdan önem taşıyabilir (Nies ve Keppler, 2007).

MRP-3

MRP-3 geni, MRP-2'nin hemen ardından klonlanmıştır (Belinsky vd., 1998; Kool vd., 1999b; Konig vd., 1999b). 1997 yılında keşfedilen MRP-3 taşıyıcı proteini, 17. (17q21) kromozomda yer alır ve MRP-1'in en fazla homoloğu (%58) olan proteindir. MRP-1'e benzer şekilde MRP-3 polarize hücrelerin bazolateral membranlarında ifade edilir (Kool vd., 1999b; Konig vd., 1999b). MRP-1 ve MRP-2'ye yapı olarak çok benzemesine rağmen, direnç mekanizmasında glutatyon aracılık etmez (Hirohashi vd., 1999; Kool vd., 1999b). İnsanlarda MRP-3 ağırlıklı olarak adrenal bezlerde, böbrekte, ince bağırsakta, kolonda, pankreasta ve safra kesesinde; daha düşük seviyede akciğerlerde, dalak, mide ve bademciklerde ifade edilir (Kool vd., 1997, 1999b; Konig vd., 1999b; Scheffer vd., 2002a; Borst vd., 2006). MRP-3 hepatositlerin bazolateral membranında bulunur ve safra tuzlarının salgısı engellendiği zaman organik anyonların karaciğerden kana atılmasına izin verebilir (Konig vd., 1999a,b; Kool vd., 1999b). MRP-3 ifadesinin neden adrenal kortekste yüksek olduğu hala tespit edilememiştir (Kool vd., 1999b). MRP-3 ifadesinin kolestatik insan (Scheffer vd., 2002a), rat karaciğeri (Soroka vd., 2001) ve karaciğer kanaliküler membranlarında MRP-2 fonksiyon eksikliği olan DJS'li hastalarda upregüle olduğu tespit edilmiş olup, karaciğerde MRP-2'nin kaybını telafi edici rol oynuyor görünmektedir (Konig vd., 1999b). MRP-3'ün fizyolojik fonksiyonu hala belirlenememiştir.

İnsan MRP-3 genindeki mutasyonlarla ilişkili bir hastalık yoktur ve bununla tutarlı olarak MRP-3 nakavtlı fare sağlıklı ve belli farmakolojik ajanlarla karşılaşana kadar farklı bir fenotip göstermez (Borst vd., 2007; Kruh vd., 2007a; Lagas vd., 2009). Bu fare MRP-3'ün fizyolojik rolüne henüz büyük bir katkı sağlamamıştır çünkü kolestatik şartlarda hepatik sinüzodial membrandaki MRP-3 ifadesi sıklıkla upregüledir. MRP-2 aracılı taşıma bozulduğunda MRP-3'ün safraya toksik karaciğer metabolitlerinin kan aracılığıyla temizlenmesinde yedek bir sistem sunması yaygın bir görüştür (Donner ve Keppler, 2001; Belinsky vd., 2005; Zelcer vd., 2006; Borst vd., 2007). Bu görüş MRP-2/MRP-3 çifte nakavtlı fare çalışmalarıyla desteklenmiştir (Lagas vd., 2009).

İnsan hepatoselüler karsinomlarında (Nies vd., 2001), öncü yumurtalık kanserinde (Ohishi vd., 2002) ve yetişkin ALL'de (Plasschaert vd., 2005) MRP-3 ifadesinin

seviyelerinde yükseklik tespit edilmiştir. Ek olarak MRP-3'ün yüksek ifadesi çocukluk ve yetişkin ALL ve yetişkin AML'de bir prognostik faktör olarak varsayılmıştır (Plasschaert vd., 2005; Benderra, vd., 2005). MRP-3 etoposide, teniposide ve methotrexate gibi antikanser substratları MRP-1 ve MRP-2'ye kıyasla daha az taşır (Kool vd., 1999b; Zelcer vd., 2001; Lagas vd., 2010). MRP-3'ün veziküler taşıma deneylerinde methotrexate'i taşıyabildiği gözlemiyle uyumlu şekilde (Hirohashi vd., 1999), polarize hücreler kısa süreli methotrexate'e maruz kaldığında direnç gözlenmiştir (Kool vd., 1999b). Bu protein, henüz moleküler seviyede tanımlanmamasına karşın hem taşıma bağlanma bölgesi hem de modülatör bölgesi içerdiği gösterilmiştir (Borst vd., 2007). Bazı çalışmalarda MRP-3 ifadesi klinik olarak direnç ve zayıf kemoterapötik cevapla ilişkilendirilmesine rağmen MRP-3'ün ilaç dirençliliğindeki rolünü anlaşılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

MRP-4

MRP-4, 13. (13q31) kromozom tarafından kodlanır ve MRP-1'le %41 aminoasit benzerliği paylaşır. Nükleosid monofosfat antiviral ajan Adefovir'in (PMEA) tanımlanan ilk fonksiyonel taşıyıcısıdır (Schuetz vd., 1999). Zidovudin (AZTMP) gibi HIV ilaçlarına karşı direnç oluşumunda da rolü vardır. PMEA ve AZTMP organik anyonlardır ve bundan dolayı MRP-4 bir MRP aile üyesinden beklendiği gibi organik anyon taşıyıcısı olarak düşünülebilir. Ayrıca MRP-4 fosfat konjugatları için özgül bir taşıyıcı olabilir. MRP-4 tüm dokularda düşük seviyelerde bulunurken prostatta yüksek seviyelerde bulunmuştur (Russel vd., 2008). MRP-4 ilginç membran trafiği özelliklerine sahip olduğundan dolayı dokunun nerede bulunduğuyla ilgili olarak polarize hücrelerin apikal ve bazolateral membranlarında yer alabilir. Örneğin prostat hücrelerinde ve hepatositlerde MRP-4 bazolateral membranda yer alırken, böbrek proksimal tübüllerinde ve beyin kılcallarında apikal membranda bulunur (Nies vd., 2004; Borst vd., 2007; Russel vd., 2008). MRP-4'ün dokuya spesifik membran lokalizasyonunun altında yatan mekanizma farklı hücre tiplerindeki adaptörlerle ve katlanmış proteinlerle etkileşimle ilgili görünmektedir (Hoque ve Cole, 2008; Hoque vd., 2009). Daha sonra yapılan in vitro ve MRP-4 nakavtlı fare çalışmaları bu taşıyıcının geniş bir substrat spesifitesine sahip olduğunu göstermiştir (Borst vd., 2007; Kruh vd., 2007a; Ho vd., 2008; Fletcher vd., 2010).

MRP-4'ün ilaç dağılımı ve eliminasyonundaki önemini gösteren çoğu kanıt MRP-4 nakavtlı fareden gelir. Bu fare ilaçların yokluğunda farklı bir fenotip göstermez (Leggas vd., 2004). MRP-4 nakavtlı farede çoğu ilacın renal eliminasyonu azalır ve böbrekte MRP-4 için anahtar koruyucu bir rol önerir (Hasegawa vd., 2007; Ci vd., 2007; Russel vd., 2008). PGE2 içeren çeşitli eikanasoidler MRP-4'ün substratıdır (Reid vd., 2003a; Borst vd., 2007). Ağrı ve inflamasyonun en iyi düzenleyicisi olarak bilinen PGE2 bazı tümörlerin gelişimine olduğu kadar, büyümesinin uyarılmasına, anjiyogenezine ve sitotoksik kemoterapi cevabına da karışır (Reid vd., 2003b; Lin vd., 2008; Hanaka vd., 2009). NSAID ilaçlar (celecoxib) gibi MRP-4 inhibitörleri, adefovir veya methotrexate gibi sitotoksik ilaçlarla birlikte uygulandığında klinik olarak belirgin böbrek toksisitesi sağlayabilir (Reid vd., 2003a,b; Russel vd., 2008). MRP-4 nakavtlı fare tiyopurinlerin hematopoietik toksisitesine de daha hassastır (Krishnamurthy vd., 2008). MRP-4'ün rapor edilen diğer substratları GSH, sülfatlanmış safra asitleri, GSH konjugeli LTB4 ve LTC4'ü içerir (Kruh vd., 2007a; Rius vd., 2008). MRP-4 ilaç taşıma fonksiyonuyla eşit önemdeki çeşitli endojen metabolitlerin hücresel atımını yönlendirir ve bu durum hücre proliferasyonu, farklılaşması, hücre döngüsü işlemi ve apoptozis gibi işlemlerle ilgili sinyal yollarında anahtar rol oynar. MRP-4, cAMP (ve cGMP) moleküllerini taşır ve bu akıştaki protein kinazlar harici sinyallerin yerini alır (van Aubel vd., 2002; Sassi vd., 2008). MRP-4'ün cAMP (ve cGMP)'ye nispeten düşük ilgisi nedeniyle sıklık nükleotidlerin hücre içi seviyeleri düzenlemesindeki rolü sorgulanmıştır (Borst vd., 2007). Sıklık nükleotid sinyalleşmesinin yüksek derecede bölümlendiğine dair büyüyen kanıtlar, MRP-4'ün cAMP'nin tüm hücre konsantrasyonlarını düzenlemektense yerel mikro alan seviyeleriyle ilgilendiğini gösterir (Li vd., 2007).

MRP-4 prostat tümörleri ve nöroblastomayı içeren bazı tümörlerin yüksek proliferatif gelişiminde gösterilmiştir (Nies vd., 2004; Ho vd., 2008; Fletcher vd., 2010). MRP-4 bazı antineoplastik aktiviteleri olan 9-(2- phosphonylmethoxyethyl) guanine'e karşı direnci tercih eder. Adefovir ve diğer antiviral ilaçlara ek olarak MRP-4 tiyopurin analogları, methotrexate ve topotecanı içeren antikanser ajanlarına da direnç sunar (Leggas vd., 2004; Deeley vd., 2006; Kruh vd., 2007a; Russel vd., 2008; Krishnamurthy vd., 2008). Tiyopurin analogları ve nükleozid tabanlı kemoterapatik ilaçların çoğu farmakolojik aktivitelerini göstermeden önce hücre içi fosforilasyon gerektirir. Sonuç olarak MRP-4 bu ajanlara ana bileşiklerinden ziyade

onların anyonik fosfat metabolitlerini atarak direnç gösterir (Wielinga vd., 2002; Reid vd., 2003b). MRP-4 zengini izole membran vezikülleriyle yapılan çalışmalar MRP-4 transfekte hücreleri kullanır ve bu taşıyıcının substrat spesifitesi bu sınıf ilaçların ötesine uzanır (Deeley vd., 2006; Borst vd., 2007; Russel vd., 2008; Lagas vd., 2009).

MRP-5

MRP-5, 3. (3q27) kromozom tarafından kodlanan ve sekans etiketlerinin veritabanında görüntülenmesi sonucunda tanımlanmış (Kool vd., 1997), fakat fonksiyonel olarak ilk kez Wijnholds ve arkadaşları tarafından nükleozid analoglarının taşınmasıyla karakterize edilmiştir (Wijnholds vd., 2000a). MRP-5, MRP-1'le yalnızca %38 aminoasit benzerliği paylaşır. Çoğu dokuda MRP-5 mRNA'sı düşük seviyede olmasına karşın MRP-5 proteinin doku dağılımını belirleyici immünolokalizasyon çalışmaları için uygun antikorların kısıtlı ulaşımından dolayı, yalnızca kısmen karakterize edilmiştir (Nies vd., 2002, 2004; Borst vd., 2007). MRP-5 mRNA'sı iskelet kası, kalp, beyin, kornea ve insan genitoüriner sistemi dokularının düz kaslarında maksimum ifade edilmekle birlikte çoğu normal dokuda düşük seviyelerde ifade edilir (Dazert vd., 2003; Nies vd., 2004; Calatuzzolo vd., 2005; Karla vd., 2009). MRP-1 gibi MRP-5 de beyin kılcalları endotelial hücreleri, piramidal nöron ve astrositlerde lümen tarafında yerleşmiştir (Nies, 2002, 2004). MRP-5'in bu dokulardaki fizyolojik rolü bilinmemektedir. MRP-5'in bazı polarize epitelial hücrelerinde bazolateral membranda lokalize olduğu rapor edilmiştir, fakat beyin kılcalları endotelial hücrelerinde apikal membranda yer alır (Nies vd., 2004; Borst vd., 2007). Bu durumda MRP-5 de belki MRP-4 gibi ikili membran lokalizasyonuna sahip olabilir fakat bu kararı destekleyecek çok az veri vardır.

MRP-5 tarafından in vitro olarak taşınan fizyolojik metabolitler folik asit ve glukoronid konjugatları olduğu kadar GSH ve GSH konjugatlarını da içerir (Borst vd., 2007). Ek olarak MRP-5 tercihen metile olmamış tiyonükleotidleri atarken MRP-4 metile tiyoiyanozin monofosfatı tercih ediyor görünmektedir (Reid vd., 2003a). Veziküler taşınma çalışmaları MRP-5'in substrat profilinin DNP-SG ve GSH gibi organik anyonları da içerdiğini göstermektedir (Reid vd., 2003a,b; Wijnholds vd., 2000a). MRP-5, MRP-4 gibi sıklıkla nükleotid organik anyon taşıyıcısı olup

cGMP, cAMP gibi belli monofosfat nükleotid metabolitlerin, çeşitli organik anyonların ve belli pürin analoglarının atımına aracılık etmektedir (Jedlitschky vd., 2000). MRP-5'in, MRP-4 ve MRP-8 ile paylaştığı ortak bir özellik olarak siklik nükleotidlerden özellikle cGMP'nin taşınması yer almaktadır (Reid vd., 2003a; Jedlitschky vd., 2000). Örneğin insan eritrositleriyle yapılan veziküler çalışmalar MRP-5'in cGMP için yüksek ilgide cAMP için düşük ilgide bir taşıyıcı olduğunu gösterir (Wu vd., 2005; Chen vd., 2005). Sonuç olarak MRP-5 bazen siklik nükleotid atım pompası olarak adlandırılır. MRP-5'in substrat özgüllüğü ve ilgisiyle ilgili literatürde henüz çözülmemiş bazı tutarsızlıklar vardır (Borst vd., 2007).

Nakavt fare kullanılarak yapılan çalışmalar bugüne kadar MRP-5'in fonksiyonel aktivitesi hakkında çok az bilgi vermiştir. MRP-5 nakavtlı fare normal, doğurgan ve en az 1 yıl herhangi bir anormal fenotip göstermemektedir (Wijnholds vd., 2000a). MRP-5 mutasyonlarıyla ilişkili bilinen bir hastalık yoktur.

MRP-5 seviyelerinin akciğer, kolon, pankreatik ve göğüs kanseri örnekleri ve kalpte de iskemik atakları takiben yükseldiği raporlanmıştır (Dazert vd., 2003; Calatuzzolo vd., 2005; Hagmann vd., 2009). MRP-5'in yüksek ifadesinin sonucu olarak PME'A'ya (Karla vd., 2009) olduğu kadar cisplatin, purin analogları, pirimidin analogları ve 5-FU, doxorubicin ve methotrexate gibi çeşitli antikanser ilaçlarına direnç gösterdiği rapor edilmiştir (Oguri vd., 2000; Yoshida vd., 2001; Wielinga vd., 2002, 2005; Pratt vd., 2005). MRP-5'in anti-retroviral ve kanser kemoterapisine klinik dirençteki rolünü anlamak için daha fazla çalışma gereklidir.

MRP-6

MRP-6, 16. (16p13.1) kromozom tarafından kodlanır ve iki genin gen duplikasyonu olayıyla ortaya çıkabileceğinin bir kanıtıdır. MRP-6 geni 16. kromozom üzerinde, MRP-1'in yanında yer alır ve genomik DNA'nın yaklaşık 73 kb'nı kapsayan 31 ekzondan oluşmaktadır (Kool vd., 1999a). İki genin yapı ve organizasyonu benzer olup kodlanan proteinler büyüklük ve topolojik olarak karşılaştırılabilir. İnsan MRP-6 geni 190 kDa büyüklüğündedir ve MRP-1 ile %45 aminoasit benzerliği paylaşır. MRP-6 proteininin 3' ucunun ARA proteiniyle neredeyse identik olduğu gösterilmiştir (Kool vd., 1999a; Belinsky ve Kruh, 1999). Genetik yakınlığı ve in vitro özelliklerinin benzerliğine karşın, MRP-6 ve MRP-1'in in vivo fonksiyonları

farklıdır. MRP-6 mRNA'sının en yüksek seviyesi karaciğer ve böbrekte tespit edilmesine rağmen, deri ve retinayı içeren diğer çoğu dokuda da düşük seviyeleri tespit edilmiştir (Kool vd., 1999a; Scheffer vd., 2002b; Boraldi vd., 2003). Polarize epitel hücreleriyle yapılan çalışmalarda MRP-6'nın organik anyonları taşıdığı ve glukoronid konjugatları daha zayıf taşınması dışındaki özelliklerinin MRP-1 ile MRP-3'e benzediği tespit edilmiştir. Veziküler taşınma deneylerinde GSH konjugeli LTC₄'ün ve DNP-SG'nin taşınmasına aracılık ettiği fakat östradiol glukoronid ve siklik nükleotidlerinkine etmediği gösterilmiştir (Belinsky vd., 2002; Lias vd., 2002).

MRP-6'daki mutasyonlar bir kaltsal bağ doku bozukluğu olan PXE'nin (Pseudoxanthoma Elasticum) genetik temelini vücutta öncelikle deri, göz ve kardiyo vasküler sistemdeki elastik dokuları etkilediğini göstermiştir (Hu vd., 2003; Gorgels vd., 2005; Klement vd., 2005; Uitto vd., 2010).

MRP-6'nın fizyolojik fonksiyonu ve ilaç direncine potansiyel katılımı hala açık değildir. Dirençli tümör hücrelerinde MRP-6 geninin tamamen ya da kısmen yüksek ifadesinin yalnızca MRP-1 genini yüksek ifade eden hücre hatlarında bulunmuştur. MRP-6 veya onun parçası ARA yalnızca MRP-1 ile birlikte ampfliye olur, çünkü kromozom 16 üzerinde yanyana bulunmaktadır (Kool vd., 1999a). MRP-6 epirubicin dirençli insan lösemi hücrelerinde bulunmuştur (Longhurst vd., 1996; O'Neill vd., 1998; Kuss vd., 1998). MRP-6 transfekteli hücreler etoposide, teniposide, doxorubicin, daunorubicin, actinomycin D ve cisplatin gibi çeşitli antikanser ilaçlara düşük seviye direnç gösterir (Belinsky vd., 2002). Şimdiye kadar MRP-6'nın klinik çoklu ilaç direncindeki rolünü destekleyecek bir kanıt yoktur.

MRP-7

MRP-7, tanımlanmış uzun MRP'lerin sonucusudur ve en az karakterize edilenidir. MRP-7, 6. (6p21) kromozom tarafından kodlanmaktadır. MRP-7, bu kromozomu glutasyon metabolizmasındaki genlerle paylaşmaktadır ve Glutasyon S-konjugatları ile ilgili ilaçlara karşı birlikte direnç oluşturmaktadırlar (Avcu, 2009). MRP-7 diğer MRP ailesi üyeleriyle en az aminoasit sekans benzerliği (%33-36) gösterir (Hopper vd., 2001). MRP-7'nin molekül yapısı uzun MRP'lere çok benzemesine karşın N-glikozilasyon bölgelerinden yoksundur (Hopper vd., 2001; Kruh vd., 2007b). Bu farklılığın fonksiyonel bir farklılık sağlayıp sağlamadığı henüz bilinmemektedir.

İnsan MRP-7 geninin 22 ekzon ve 21 intron içeren yapı ve organizasyonu ile diğer MRP genlerinden de belirgin şekilde farklıdır (Kao vd., 2003). MRP-7 mRNA'sı diğer dokularda da tespit edilebilmesine rağmen kolon, deri ve testislerde yüksek ifade olur (Hopper vd., 2001). MRP-7 diğer MRP'lerin yaptığı gibi organik anyonların geniş oranını in vitro olarak taşıyabilir. MRP-7, E217βG gibi glukoronat konjugatları ve LTC4 gibi GSH konjugatlarının düşük derecede taşınmasına aracılık eder (Chen vd., 2003; Hopper-Borge vd., 2004). MRP-7'nin diğer MRP aile üyeleri gibi anyonik ve lipofilik ligandlarla etkileşebilen çift taraflı substrat bağlanma cebine sahip olduğu varsayılmıştır. MRP-7'nin fizyolojik ve farmakolojik in vivo rolünün anlaşılması için MRP-7 nakavt fare modeli zinciri yetiştirilip bu farenin doğurgan ve sağlıklı görüldüğü rapor edilmiştir (Kruh vd., 2007b).

MRP-7 ifadesi, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde paclitaxel (Oguri vd., 2008) veya vinorelbine (Bessho vd., 2009) ilaçlarının her birine maruziyet sonrası tespit edilmiştir. Vincristine muamele edilmiş insan ve fare tükürük bezi adenokarsinoma hücrelerinde P-gp ve MRP-1 ile birlikte MRP-7'nin de artan seviyede ifade edildiği rapor edilmiştir (Naramoto vd., 2007). MRP-7 aracılı direnç docetaxel, paclitaxel, vincristine, vinblastine gibi antikanser ajanlara, Ara-C ve gemcitabine gibi nükleozid tabanlı ajanlara ve epothilone B gibi mikrotübül stabilize edici ajanlara direnç gösterdiği rapor edilmiştir (Hopper-Borge vd., 2004, 2009). MRP-7 ifadesiyle ilişkili direnç spektrumu MRP-1 ve MRP-2'den daha dar olup atrasiklinlere direnç içermediği için MRP-3'e daha benzerdir. Bu ilginç laboratuvar bulgularına karşın kanser hastalarında MRP-7'nin klinik ilaç direnci veya hassasiyetinde rolünü destekleyen hala az bir kanıt vardır.

MRP-8

MRP-8 ilk kez göğüs kanserinde yüksek derecede ifade edilmesiyle, gen tahmin etme programı ve EST veritabanı çalışmaları aracılığıyla tanımlanmış olup (Bera vd., 2001) 16. (16q12) kromozom tarafından kodlanmaktadır. 2001 yılında keşfedilen bu MRP üyesi %40 oranında MRP-5'le identiktir ve diğer MRP'lerden yapısal olarak daha küçüktür (Belinsky vd., 1998; Bera vd., 2001; Yabuuchi vd., 2001). Bu gen için çoklu mRNA formları tanımlanmışken MRP-8 taşıyıcısının tam uzunluğunun 1382 aminoasit olduğu tahmin edilmektedir (Yabuuchi vd., 2001; Tammur vd., 2001). Bazı araştırmalar MRP-8 mRNA transkripti ifadesinin yüksek seviyelerinin

karaciğer, beyin, plsentta, göğüsler ve testislerle sınırlı olduğunu önermiştir (Bera vd., 2001). MRP-8 proteini, insan merkezi ve çevresel sinir sistemi nöronlarının aksonlarında da tespit edilmiştir ve DHEAS gibi nöromodülatör steroidlerin atımında rol oynayabilir (Bortfeld vd., 2006). Veziküler çalışmalar MRP-8'in cGMP, cAMP gibi siklik nükleotidleri, LTC₄, DNP-SG, östradiol glukoronid gibi lipofilik anyonları ve DHEAS, östron sülfat, glukoronid steroidler, folik asit gibi sülfatlı konjugatların geniş bir oranını taşıyabildiğini göstermektedir (Jedlitschky vd., 2000; Wu vd., 2005; Chen vd., 2005; Deeley vd., 2006; Kruh vd., 2007b). Bu moleküllerin herhangi birinin MRP-8'in fizyolojik substratı olup olmadığı bilinmemektedir.

MRP-8 (ABCC11)'de keşfedilen tek nükleotid polimorfizmi 538G>A, MRP-8 için serumöz apokrin bezlerden salgılanan kulak kiri tipini (serumen) belirleyen fizyolojik bir fonksiyonu açığa çıkarmıştır. Doğu Asya popülasyonlarında yaygın olan AA genotipli bireyler kuru kulak kiri salgımlarken, Avrupa ve Afrika kökenli bireylerde yaygın olan GG veya GA genotipli bireyler ıslak kulak kiri üretir (Yoshiura vd., 2006; Toyoda vd., 2009).

MRP-8 transfekteli hücre hatları PME_A, methotrexate, Ara-C ve 5-FU gibi antimetabolitlere direnç gösterir (Guo vd., 2003; Pratt vd., 2005; Kruh vd., 2007b). Başka bir çalışma MRP-8'in yüksek ifadesinin AML hastalarının genel sağkalımının düşük olma ihtimaliyle ilişkili olduğunu rapor etmiş ve MRP-8'in AML'in tedavi sonuçlarını öngören bir biyomarkır olabileceğini önermiştir (Guo vd., 2009). MRP-8'in insan dokularında seviyeleri ve aktivitesi henüz oluşturulmamıştır. MRP-8'in klinik çoklu ilaç direncinde rol oynayıp oynamadığına görüş sağlamak için daha fazla çalışma gereklidir.

MRP-9

MRP-9, 16. (16q12) kromozom tarafından kodlanmaktadır. 2001 yılında keşfedilen bu MRP üyesinin %42 oranında MRP-5 ile identiktir ve diğer MRP'lerden yapısal olarak daha küçüktür. MRP-9 (ABCC12), MRP-8 (ABCC11) geniyle aynı kromozom üzerinde yer alır ve iki genin bir gen duplikasyonu olayıyla ortaya çıktığının önerilmesine sebep olan 20kb uzaklıkta bulunmaktadır (Yabuuchi vd., 2001; Tammur vd., 2001). ABCC12'nin 1359 aminoasitten oluşan bir protein kodlayan tam mRNA transkriptiyle birlikte çoklu eklenme çeşitleri de vardır

(Yabuuchi vd., 2001; Bera vd., 2002). İnsan embriyonik böbrek hücrelerinde tam uzunluktaki insan ABCC12 geni ifade edildiğinde 150kDa büyüklüğünde bir protein oluşur fakat protein glikozile değildir ve plazma membranına yerleşen diğer MRP'ler gibi baskın olarak ER'de bulunur (Ono vd., 2007). MRP-9 transkriptleri yumurtalık, beyin, testisler, göğüs ve prostatta ifade edilir (Bera vd., 2002; Shimizu vd., 2003; Maher vd., 2005; Augustine vd., 2005). MRP-9'un erkek mayotik profazın geç bölümü boyunca, spermatid gelişimi ve sperm fonksiyonunda rol oynayabileceği tahmin edilmektedir, çünkü tam uzunluktaki MRP-9 yalnızca testiküler germ hücrelerinde, fare ve domuz sperminde ifade olur (Ono vd., 2007). Veziküler taşıma deneylerinde rekombinant ABCC12 proteini, ne diğer MRP'lerin taşıdığı organik anyonları taşır ne de sitotoksik ajanlara direnç sunabilir (Slot vd., 2011). Şimdiye kadar MRP-9'un fizyolojik rolü ve kanser kemoterapisiyle ilgisi rapor edilmemiştir.

ABC taşıyıcılarının genel özellikleri Çizelge 2.3.'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. ABC taşıyıcılarının genel özellikleri (Chen ve Tiwari, 2011).

TAŞIYICI	GEN	KROMOZOM	AMİNOASIT	DOKU İFADESİ	FİZYOLOJİK SUBSTRATLARI	DİRENÇ PROFİLİ	GSH İLE ÇALIŞMA	NEREDE BULUNUR
P-GP/MDR1	ABCB1	7q21.12 (4872 bp)	1280	Bağırsak, karaciğer, böbrek, plösent, kan-beyin bariyeri	Nötral ve katyonik organik bileşikler, çok yaygın kullanılan ilaçlar	Doxorubicin, daunorubicin, vincristine, vinblastine, actinomycin-D, paclitaxel, docetaxel, etoposide, teniposide, bisantrene, homoharringtonine, Gleevec (STI-571)	-	APİKAL
MRP1	ABCC1	16p13.12 (5927 bp)	1531	Yaygın	LTC ₄ , E ₃ 17βG, sulfatlanmış safra asitleri, folik asit, bilirubin, GSH konjugatları	Anthracyclines, camptothecins, vinca alkaloids, antifolate neoplastics (MTX, edatrexate), etoposide, irinotecan, SN-38	+	BAZAL
MRP2	ABCC2/cMOAT	10q24.2 (4930 bp)	1545	Karaciğer, böbrek, bağırsak	Bilirubin konjugatları, LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄ , GSH	Anthracyclines, camptothecins, vinca alkaloids, MTX, etoposide, cisplatin, irinotecan	+	APİKAL
MRP3	ABCC3/MOAT-D	17q21.33 (5176 bp)	1527	İnce bağırsak, pankreas, kolon, böbrek, plösent, adrenal bezler	Taurocholate, glycocholate, cholate, E217βG, LTC ₄	MTX, teniposide, etoposide	-	BAZAL
MRP4	ABCC4/MOAT-B	13q32.1 (5871 bp)	1325	Prostat, testis, yumurtalık, akciğer, hepatositler, bağırsak, pankreas	cGMP, cAMP, PGE ₁ , PGE ₂ , E217βG, DHEAS, GSH, ve GSH konjugeli safra asitleri, LTB ₄ ve LTC ₄	MTX, 6-TG, 6-MP, SN-38, irinotecan, topotecan, PMEA, AZT	+	APİKAL, BAZAL
MRP5	ABCC5/MOAT-C	3q27.1 (5851 bp)	1437	Tüm ana dokular	cGMP, cAMP, DNP-SG, GSH, DNP-SG	5-FU, 6-MP, 6-TG, MTX, cisplatin, PMEA, AZT, daunorubicin, DOX, gemcitabine, Ara-C	+	BAZAL
MRP6	ABCC6/MOAT-B/PXE	16p13.12 (5111 bp)	1503	Böbrek, karaciğer	LTC ₄ , DNP-SG	DOX, daunorubicin, etoposide, teniposide, cisplatin, actinomycin-D	+	BAZAL
MRP7	ABCC10	6p21.1 (5118 bp)	1492	Çoğu dokular	E217βG, LTC ₄	Paclitaxel, docetaxel, vincristine, vinblastine, Ara-C, gemcitabine, epothilone-B	+	BAZAL
MRP8	ABCC11	16q12.1 (4576 bp)	1382	Testis, göğüs	cGMP, cAMP, E217βG, DHEAS, LTC ₄ , bile acids, estrone 3-sulfate, DNP-SG, folic acids	5-FU, MTX, Ara-C, PMEA, ddC	?	APİKAL, BAZAL
MRP9	ABCC12	16q12.1 (5168 bp)	1356	Testis, göğüs, yumurtalık, beyin, iskelet kasları	Bilinmiyor	Bilinmiyor	?	?

2.4.1.2 ABC Taşıyıcılarıyla İlgili Direnci Geri Çevirme

Çoklu ilaç dirençliliğine ilaç taşıyıcılarının potansiyel katılımı, kanser hastalarında bu taşıyıcıları engelleyebilecek bileşiklerin araştırılmasına yol açmıştır. Bu araştırmalar P-gp için başarılı olup siklosporin A analoğu PSC833 ve karboksamid türevi GG918 etkili inhibitör örnekleridir (Ford vd., 1996; Sikic, 1997; Sandor vd., 1998). Çoğu bileşiğin P-gp aktivitesini engellemede çok etkili olduğu kanıtlanmışken bunlardan yalnızca bir kaçı MRP'ler üzerinde de aktiftir (Ford ve Hait, 1991). Örneğin iyi karakterize edilmiş P-gp inhibitörleri olan verapamil ve siklosporin A, ilaçla seçilen MRP-1 transfekteli hücrelerde genellikle ilaç hassasiyetinde yalnızca küçük bir etki gösterirler (Cole vd., 1992b, 1994; Gollapudi ve Gupta, 1992; Barrand vd., 1993; Zaman vd., 1994). P-gp'yi etkili bir şekilde engelleyen bileşikler MRP-1 veya MRP-2 için yalnızca düşük bir ilgiye sahiptir bundan dolayı bu bileşikler insan kanserlerinde MRP'leri inhibe etmek için kullanmak yararlı olmayacaktır (Wallstab vd., 1999).

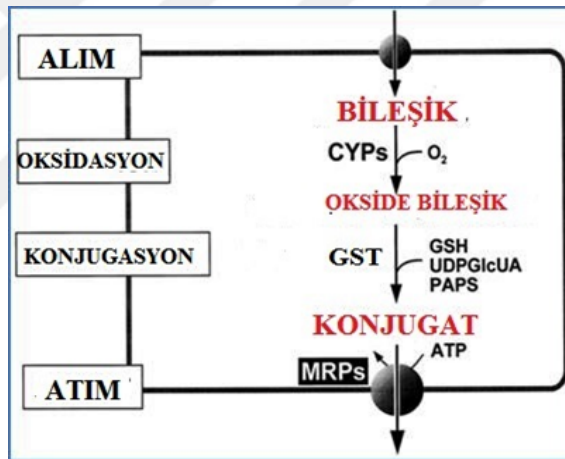
MRP-1 ilişkili direnci en az bir model sistemde belirgin seviyede çeviren dihydropyridin nikardipin ve NIK 250 (Cole vd., 1989; Abe vd., 1995), difloxacin (Gollapudi vd., 1995), bisindolymaleimid GF109203X (Gekeler vd., 1995a), MK571 (Gekeler vd., 1995b), tiapamil analoğu DMDP (Cole, 1992b) ve siklosporin analoğu PSC833 (Barrand vd., 1993) içeren bileşikler rapor edilmiştir. Bu bileşiklere hassasiyet sıklıkla ilaca ve test edilen hücre tipine bağlıdır (Versantvoort vd., 1993, 1994; Leier vd., 1994; Gekeler vd., 1995b). MRP-1 ve MRP-2 için yüksek ilgiye sahip substratların çoğu dayanıklı bir hidrofobik kısmı olan organik anyonlar olup güçlü rekabetçi inhibitör örnekleri aynı zamanda yüksek ilgili substratlardır örneğin; LTC₄, S-desilglutasyon ve LTD₄ antagonisti MK571 (Loe vd., 1996a,b,c; Keppler vd., 1998). MRP-1'in diğer inhibitörleri ürik asit taşınımını inhibe etmek için orijinal olarak geliştirilen sulfinpirazon, benzbromaron ve probenesid gibi organik asitlerdir (Hollo vd., 1996). MRP-1 ve MRP-2 benzer substrat özgüllüğüne sahip olmasına rağmen MRP-1 inhibitörleri MRP-2 için yeteri kadar iyi inhibitör değildir (Evers vd., 1998). P-gp'yi geri çevirici ajanlar araştırmasındaki gibi MRP'lere spesifik inhibitörler sentezlemek zordur. Sonuç olarak çeşitli MRP transfekteli hücreleri kullanarak bu taşıyıcı proteinlerine özgü direnci geri çevirici ajanlar tanımlanabilir (Lautier vd., 1996).

MDR proteinleri aracılı direnci geri çevirmedeki diğer bir alternatif yaklaşım antisense oligonükleotidlerin (siRNA, RNAi, miRNA) veya sentetik katalitik RNA'ların (ribozim) kullanımıdır. Bu yaklaşımların protein yapısı ve fonksiyonuna bağımlı olmaksızın P-gp aracılı direnci çevirmede kullanımı başarılı olmuştur (Kiehnopf vd., 1994; Quattrone vd., 1994; Holm vd., 1995; Chen vd., 2006). Fakat bazı çalışmalarda bu stratejilerin kullanımı P-gp aracılı direnci geri çevirebilirken, MRP-1 aracılı direnci geri çeviremediği gösterilmiştir (Sadava ve Hamman, 2007). Bazılarında ise MRP-1 mRNA ve protein seviyelerindeki azalmanın kısa süreli olduğu ve doxorubicine kısmen hassas olduğu bildirilmiştir (Stewart vd., 1996). Son yıllarda yapılan diğer çalışmalarda ise MRP-1 ifadesinin de siRNA ile geri çevrilebildiği rapor edilmiştir (Golalipour vd., 2006; Wu vd., 2011). Tümör hücre biyolojisinde miRNA'ların kullanımı siRNA'lara göre aynı genetik yolları ve özellikleri hedeflemede daha etkilidir (Tagliaferri vd., 2012; Di Martino vd., 2016). En son çalışmalar miRNA'ların kullanımının klasik sinyal yollarını yeniden düzenlediği ya da engellediğini önermektedir (Egan vd., 2016). MDR ilişkili genlerin engellenmesi amacıyla bu yaklaşımların kullanıldığı daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

2.4.2 İlaç Metabolizmasındaki Değişiklikler

Kanser hücrelerindeki farmakokinetik çalışmalar ilacın emilimi, dağılımı, metabolizması ve detoksifikasyonu ile ilgilidir. Bir ilacın aktivitesi eninde sonunda o bileşiğin hedefine ulaşma kabiliyetine bağlıdır. Endojen bileşiklerin ve lipolik maddelerin glutatyon, glukoronat ve sülfatlı xenobiyotikler olarak biyosentezi ve hücrelerden atımı detoksifikasyonda, dolayısıyla hücresel homeostaside hayati öneme sahiptir. Endojen ve lipofilik maddelerin hücreye alım işlemi sırasında oksidasyon, glutatyon veya alternatif anyonik gruplarla konjugasyonla gerçekleşirken, hücreden atılması ATP bağımlı çalışan MRP taşıyıcıları sayesinde gerçekleşir (Şekil 2.20.). Detoksifikasyondaki bu farklı adımlar faz 0, faz 1, faz 2 ve faz 3 olarak da tanımlanabilir (Ishikawa, 1989). Genellikle Faz 0'da bulunan geniş sayıda taşıyıcı, çeşitli bileşiklerin hücresel girişini hücre içi bölümlerine ulaşmadan veya doku bariyerlerini geçmeden önce artırabilir ya da azaltabilir (Szakacs vd., 2008). Faz 1 metabolizması, yabancı bileşiklerin oksidasyonunu ve minimize edilen bileşiklerin hücre içi hedefleriyle direkt etkileşimlerini temsil etmektedir. Faz 2 reaksiyonları,

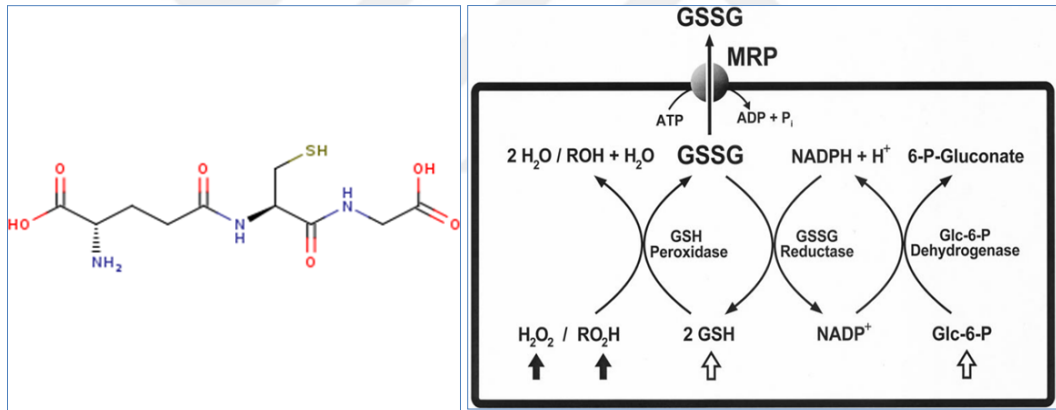
kısmen detoksifiye olan metabolitlerin konjugasyonu (glukoronidasyon veya glutamilasyon) onları zararsız ve suda çözünür metbolitler yapmakla ilgilenir. Faz 3 terimi çoktan detoksifiye olmuş taşıyıcılarla da taşınmış moleküllerin etkili eliminasyon işlemi için tanımlanır (Ishikawa, 1992). Detoksifikasyon sistemleri ve konjuge edici enzimler arasındaki sinerjizm sayesinde ilaç eliminasyonunda çok etkili bir sistem oluşturulur. Çoğu lipofilik maddenin glutatyonla konjugasyonu onların plazma membranından geçerek ekstraselüler boşluğa taşınmasını sağlar (Combes, 1965; Wahllander ve Sies, 1979). Glutatyon-S konjugatlarının taşınması eritrositleri (Kondo vd., 1980, 1982), hepatositleri (Kitamura vd., 1990; Fernández-Checa vd., 1992), kalp (Ishikawa vd., 1989) ve mastositoma hücrelerini (Schaub vd., 1991) içeren çok sayıda hücre tipinden iç-dış doğrultulu plazma membran vezikülleri kullanarak yapılan çalışmalarla ATP bağımlı bir taşınma olarak karakterize edilmiştir.



Şekil 2.20. İlaçların vücuttan uzaklaştırılması (Keppler, 1999).

Glutatyon (GSH); glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan, hücre içinde en bol bulunan, protein yapısında olmayan ve tiyol grubu içeren bir tripeptiddir (Şekil 2.21.) (Ogus vd., 1998; Aksoy, 2002). Önemli bir indirgeyici ajan ve antioksidan olan glutatyon, hücrenin oksido-redüksiyon dengesini sürdürüp hücreleri endojen ve ekzojen kaynaklı oksidanların zararlı etkilerinden korumaktadır (Mitchell ve Russo, 1987; Compoti, 1987). Glutatyona ‘ana anti-oksidan’ denmesinin nedeni, onun serbest radikalleri yakaladıktan sonra karaciğerde kendisini yenileyerek tekrar geri dönmesidir. Serbest radikaller çoğu zaman normal hücre metabolik oksidasyonunun yan ürünleri ve toksik atıklarıdır. Anti-oksidanlar tarafından etkisiz hale

getirilmediklerinde oto-immün hastalıklara ve kanser gibi kronik hastalıklara yol açabilirler. Glutasyon sağlıklı kalmak ve hastalıklardan korunmak için gerek duyduğumuz en önemli moleküllerden biridir. Vücutta 30 μM 'dan (plazmada) 3,0 mM'lara kadar (böbrek proksimal tübüllerinde) değişen konsantrasyonlarda bulunur. Bu miktarların çeşitli organların tümörlerinde 10 mM'a kadar eriştiği bildirilmiştir (Meister ve Anderson, 1983; Batist vd., 1986; Tew, 1994). Proteinlerdeki -SH gruplarının korunması ve bazı reaksiyonlarda koenzim olarak görev almasının yanı sıra aminoasitlerin transportunda, protein ve DNA sentezinde de önemli rol oynar (Ziegler, 1985). GSH'nin fonksiyonları arasında tiyol-disülfid etkileşimi, glutasyon konjugatları oluşumu ve radyoaktivite de yer alır (Konukoğlu ve Akçay, 1995). Glutasyon dokularda birbiriyle dengede bulunan, indirgenmiş glutasyon (GSH) ve okside glutasyon (GSSG) olmak üzere iki şekilde bulunur (Şekil 2.21.). İntrasellüler GSH glutasyon peroksidaz enzimi ile GSSG'ye dönüştürülür (Arrick ve Nathan, 1984).



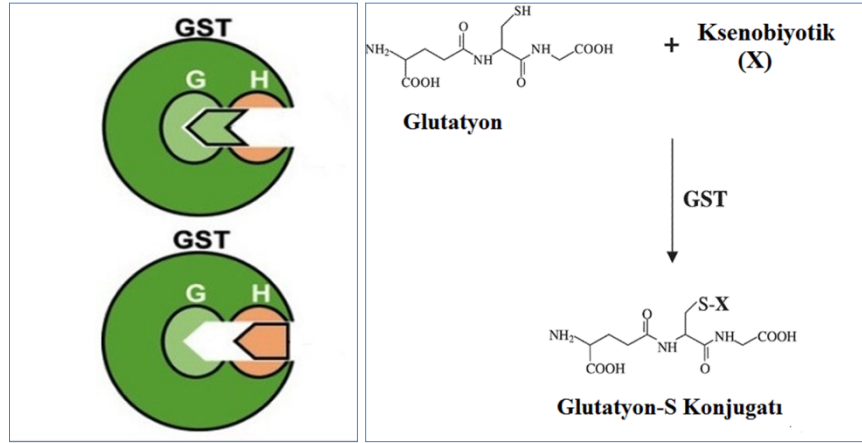
Şekil 2.21. GSH ve dokulardaki dönüşümü (Keppler, 1999).

ABC taşıyıcıları kanserdeki ilaç direncinde tanımlanan en önemli aktörlerdir. Bu taşıyıcılar geniş çeşitlilikteki toksik ajanların tanınması ve hücrelerden atılmasında ilaç metabolizmasının büyük oyuncularındırlar. Substrat özgüllüğü konusunda sitokrom P-450 ve P-gp arasında farkedilir bir benzerlik vardır (Benet vd., 2004). ABC taşıyıcıları vücudumuzu yabancı kimyasal ajanların birikiminden dinamik şekilde koruyan kemoimmünite sistemi oluşturur (Sarkadi vd., 2006). ABC taşıyıcıları spesifik substratlarını taşımanın yanında doku dağılımıyla da farmakolojide önemli bir rol oynar. Organizma için önemli farmakolojik bariyerlerde (kan-beyin bariyeri), salgılama bölgelerinde (hepatosit kanaliküler, böbrek proksimal

tübülü) ve absorpsiyon bariyerlerinde (bağırsak hücreleri) yüksek ifadeleri bulunmuştur. İlaçların amfipatik karakteri hücre membranlarına hızlı bir penetrasyon sağlasa da, ABC taşıyıcıları selüler bariyerler oluşturarak onların giriş çıkışını düzenler. P-gp modifiye olmamış nötral veya pozitif yüklü hidrofobik bileşikleri taşıırken, ABCC alt ailesi üyeleri organik anyonların ve Faz 2 metabolik ürünlerin işlem süresini uzatır. Bu atım pompalarının çoğunun glutatyon bağımlı ilaç direnci ve detoksifikasyonla ilgili bir rolü olduğu gösterilmiştir (Zaman vd., 1995; Keppler ve König, 1997; Cole ve Deeley, 1998; Rea vd., 1998; Cui vd., 1999). Glutatyon disülfidin hücreden MRP aracılı atımı nedeniyle MRP aile üyeleri oksidatif strese karşı savunmada da rol oynar (Sies ve Summer, 1975; Sies, 1988; Yamane vd., 1998).

2.4.2.1 Glutatyon S-Transferaz

Glutatyon S-transferazlar, endojen ve ekzojen kaynaklı, elektrofilik ve hidrofobik bileşiklerin glutatyon ile konjugasyonunu sağlar (Şekil 2.22.). GST'ler genellikle faz 2 detoksifikasyon işlemlerinden sorumlu olarak daha kolay atılabilen ve daha az toksik metabolitlere dönüşümü katalizleyen enzim ailesidir (Armstrong, 1987, 1991, 1997; Waxman, 1990; Hayes vd., 2005). Doğada GST aktivitesi gösteren enzimler sitozolik, mitokondriyal ve mikrozomal olmak üzere üç alt gruptan oluşmaktadır (Jakobsson, 1999; Robinson, 2004; Ladner, 2004). Memelilerde sitozolik GST'ler, kimyasal özellikleri, immünolojik reaktiviteleri ve aminoasit diziliş benzerliklerine göre alfa (α), pi (π), mü (μ), teta (θ), sigma (σ), zeta (ζ) ve omega (ω) olarak 7 gruba ayrılırlar (Mannervik vd., 1985; Hayes ve Pulford, 1995; Board vd., 1997, 2000; Hayes ve McLellan, 1999). GST'lerin birçoğu yüksek oranda polimorfizm göstermekte ve çeşitli alt birimler içermektedir. Her bir alt birim (22-29 kDa) katalitik olarak bağımsız iki farklı fonksiyonel bölgeden oluşan, dimerik proteinlerdir (Şekil 2.22.). Bu fonksiyonel bölgeler fizyolojik substratı GSH'yi bağlayan hidrofilik G-bölgesi ve hidrofobik substratları bağlayan H-bölgesidir. GST izozimlerinin, hidrofobik H-bölgesindeki aminoasit kompozisyonunun farklılık göstermesi, enzim ailesinin substrat çeşitliliğinin nedenidir (Armstrong, 1997). GST izozimleri hidrofobik H bölgesindeki aminoasit kompozisyonundaki farklılıklar nedeni ile substrat çeşitliliği (katekolaminler, prostaglandinler, lipid peroksidasyon ürünleri, aromatik hidrokarbonlar, epoksitler, kemoterapötik ajanlar) kazanmaktadır.



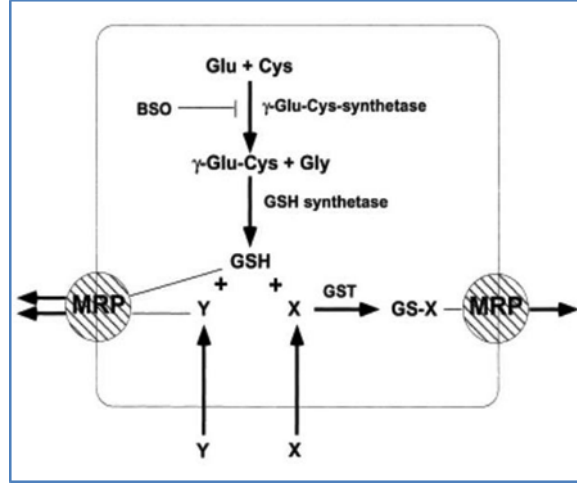
Şekil 2.22. GST'lerin yapısı (Stoddard vd., 2017) ve çalışma mekanizması (Townsend ve Tew, 2003).

Özellikle kanser terapisinde sıklıkla kullanıldığı bilinen alkilleyici ajanların birçoğunun GST'lerin substratları olduğu bilinmektedir (Townsend ve Tew, 2003). Çeşitli ilaçların sitotoksik aktivitelerinde yüksek seviye dirence yol açan GST, MRP ailesi üyelerinin yüksek ifadesinin sinerjistik etkisiyle aynı çizgidedir (Morrow vd., 1998). GST'nin ilaç direnci üzerindeki rolünü iki şekilde açıklamak mümkündür;

- GST ve MRP proteinlerinin ifadelerindeki ortak artış
- GST'nin sinyal iletimindeki rolü.

GST ve MRP Taşıyıcıları İlişkisi

Tümör hücresine anti-kanser ajanın girmesiyle birlikte hücre içinde GSH düzeyinde ve GST enziminin ifadesinde artış olmaktadır (Sau vd., 2010). GSH, GST enziminin fizyolojik substratı olarak görev yapmaktadır. Enzim, GSH yardımıyla ksenobiyotiklerin (örneğin; anti-kanser ilaçlar) protein yapısındaki çeşitli pompalar yardımıyla dışarı atılmasına neden olmaktadır (Şekil 2.23.). Artan GST aktivitesi ile birlikte ilacın hücre içinde uzun süre kalması zorlaşmaktadır. GST enzime paralel olarak MRP proteinlerinin ifadesinde de artış gözlenmektedir. MRP'ler GSH ve GSH konjugatlarının transportuyla antikanser ajanların hücreden atılımlarına aracılık etmektedir (Morrow vd., 2006). MRP'ler ve insan GST'leri arasındaki sinerjizmi gösteren literatürde birçok örnek mevcuttur (Sau vd., 2010).



Şekil 2.23. GST aracılığıyla ilaçların atılımı (Borst vd., 2000).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, tümör hücrelerinde GSH'nin yüksek düzeylere ulaşmasının ve GST'nin aşırı ifadesinin MDR gelişimi ile paralel olduğu yönündedir (Townsend ve Tew, 2003; Franco ve Cidlowski, 2009). Çeşitli insan kanser dokularında en fazla oranda üretimi olan GSTP1-1 izozimi olup kanser hücrelerinde konsantrasyonu $0,05 \times 10^{-3} \text{M}$ 'a kadar ulaşmaktadır. Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) ilaç tarama programında kullanılan 60 tümör hücre dizisinin hemen hepsinde GSTP1-1'in dominant izozim olduğu saptanmıştır (Tew vd., 1996). GST izozimlerinden GSTP1-1'in çok farklı insan kaynaklı tümörde (akciğer, kolon, böbrek, over, ösefagus ve mide) fazla miktarda salgılandığı bildirilmiştir (Green vd., 1993; Gilbert vd., 1993; Grignon vd., 1994; Tew, 1994; Hamada vd., 1994; Yang vd., 2006). Artmış GSH/GST seviyelerinin kemoterapi tedavisinde bu sistemle metabolize olan pek çok ilacın (adriamisin, klorambusil, melfalan ve diğer nitrojen alkillenleyiciler) metabolizmasını hızlandırarak ilaçla hedeflenen etkiye ulaşamamasına ve ilaca edinilmiş direnç gelişimine sebep olduğu gösterilmiştir (O'Brien ve Tew, 1996; Tew vd., 1997).

GST ve Sinyal İletimi

Kanserli hücrelerde apoptozis işlevi birçok nedenle bozulmaktadır (Tchernev, 2009). Bu duruma neden olan faktörlerden biri de GST'nin apoptotik yolda üstlendiği roldür. Birçok anti kanser ilacın GSH-konjugatlarının GST izoenzimleri aracılığıyla stresle aktive olmuş sinyal yolağını düzenledikleri bulunmuştur. Son yıllarda yapılan çalışmalar, π ve μ sınıf GST'ların, hücresel yaşam ve ölüm sinyal iletimine katılan bu

yolaktaki düzenleyici rolünün direnç gelişiminde etkili olduğunu göstermiştir. MAPK'lar hücre membranından çekirdeğe bilgi aktarımında rol oynar (Laborde, 2010). Bu kinaz ailesinin bir üyesi olan JNK'lar kemoterapötiklerin hücreyi uyarmasıyla birlikte aktive olmaktadır. GSTP'nin JNK-GSTP kompleksi sayesinde JNK1'i inhibe ettiği ve böylece programlı hücre ölümünü ortadan kaldırdığı bildirilmiştir (Wang vd., 2001; Cho vd., 2001; Townsend ve Tew, 2003). Söz konusu olan iki proteinin birbirinden ayrılması farklı mekanizmaları da beraberinde getirmekte, ilaç tedavisi sırasında birçok tümör hücresinde artan GST üretimi hücrenin kaderini değiştirmektedir (Burg ve Mulder, 2002). Kemoterapötiklere karşı gelişen direncin ortadan kaldırılmasındaki yeni tedavi yaklaşımlarından biri de tümör hücrelerinde yüksek ifade edilen GSTP-1 enziminden törapatik amaçla yararlanmaktır. Bu nedenle çeşitli GST inhibitörü bileşikler geliştirilerek in vitro ve klinik olarak denenmiştir (Mahajan ve Atkins, 2005; Zhao ve Wang, 2006). Bu ilaç adaylarını iki grupta toplamak mümkündür:

- Glutatyona yapıcı benzer bileşikler (peptidomimetikler) (Flatgaard vd., 1993; Cui vd., 2008). GSH türevleri, GST'lerin iyi birer inhibitörleri olmalarına karşın hücre içi birikimden kaçınmak için MDR proteinleri tarafından dışarı atılır ve bu nedenle kanser hücrelerinde etkilerini gösteremezler.
- İn vivo şartlarda GSH konjugatı oluşturabilen elektrofilik fonksiyonel gruba sahip inhibitörler (Ricci vd., 2005; Turella vd., 2005). Bu yaklaşım kendisi inaktif olan ve tümör hücrelerinde yükselmiş seviyelerde bulunan enzimlerin tercihen toksinlerine dönüşen ön ilaçlar uygulanmasıdır. Bu strateji ile inaktif bileşiğin normal dokulara toksisitesi azken, aktif bileşiğin tümör dokusuna fazla miktarda taşınması mümkün olmaktadır (Townsend ve Tew, 2003; Mahajan ve Atkins, 2005; Zhao ve Wang, 2006).

2.4.3 Hücre Siklusu Düzenlenmesindeki Değişiklikler

Vücuttaki tüm hücreler düzenli büyüme, bölünme ve ölüm göstermelidirler. Hücre bölünmesi temelde interfaz ve mitoz olarak iki aşamada gerçekleşir. İnterfaz, bölünmeye hazırlık aşaması olup G1, S ve G2 evrelerinden, mitoz ise profaz, metafaz, anafaz, telofaz evrelerinden oluşur. Hücre, siklus esnasında G1, G2 ve M kontrol noktalarında durarak işlemin doğru gidip gitmediğini siklin ve siklin bağımlı kinazlarla denetler. Olumsuz bir durum olmadığında hücre döngüsü devam ederken

DNA hasarı veya replikasyon kusuru gibi problemlerin olması durumunda siklus tamir işleminin gerçekleşmesi için durur. Problem tamir edilemeyecek durumdaysa hücreler programlı hücre ölümüne yönlendirilir böylece vücut homeostasisi sağlanır. Hücre döngüsü düzenleyicilerindeki ve apoptotik faktörlerdeki bozukluk kanser gelişimine katkı sağlayan bir faktördür. Hücre döngüsünün durdurulması hücrenin apoptozise gitmesine sebep olurken tersi de ilaç direncine katkı sağlayabilir. Bu yüzden hücre döngüsü aracılı ilaç dirençliliği kanser kemoterapisinde önemli bir problemdir.

P53 bilindiği gibi kanser hastalarında mutasyonu en sık görülen proteindir ve kanserlerin %50-55'inde mutanttır. Normalde esas fonksiyonu, DNA bir şekilde hasarlandığı zaman, hücre siklusunu durdurup hücrenin hasarlanmış DNA'sını tamir etmesi için ona zaman kazandırmasıdır. Bu yüzden genomun gardiyanı olarak da tanımlanır. Birçok anti-tümör ilaç, hedef olarak hücre DNA'sını seçer ve p53 seviyesini artırır. Bu aktivasyon ya hasarın tamirine ya da apoptozise yol açar (Fisher, 1994; Thompson, 1995). Bu ihtimallerin ikisi de Bax, p53, p21 gibi farklı birkaç gene bağlıdır (Joza vd., 2001). p53 (Maki vd., 1996); Bcl-2 (Chadebech vd., 1999) , p21 (Cayrol ve Ducommun, 1998), p27 (Pagano vd., 1995), c-Myc (Salvat vd., 1998), siklin A, B, D, E gibi çok sayıda hücre siklus düzenleyicilerinin ve apoptotik faktörlerin degradasyonuna aracılık eder (Sudakin vd., 1995; Clurman vd., 1996; Diehl vd., 1997). Araştırmalar p53 proteini ve onun pro-apoptotik hedefleri Bax, Puma ve Bak yükselirken anti-apoptotik Bcl-2 ifadesinin düştüğünü göstermektedir (Saha vd., 2010, 2012).

MM hücresinde p53 delesyonu veya mutasyonu gerçekleşirse, p53'le ilgili sinyal yolları ve hedefleri (p21, GADD45, Bax, Noxa, Puma) anti-apoptozis ve ilaç dirençliliği gelişmesine sebep olur (Abdi vd., 2013). Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik üyelerinin yüksek ifadesi de bir kemorezistans mekanizmasıdır.

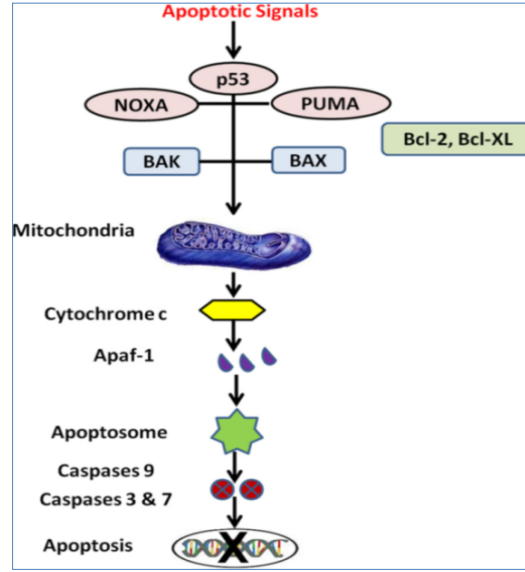
2.4.4 Apoptozis Mekanizmasındaki Değişiklikler

Apoptozis, organizma tarafından düzenlenen enerji bağımlı bir programlı hücre ölümüdür. Bu süreç, doku homeostasisinin korunmasında kritik bir role sahip olduğu gibi hasar görmüş veya tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesini de sağlar. Apoptozis regülasyonunun bozulmasının, kanser hastalıklarının oluşumunda en az artmış proliferasyon kadar büyük önem taşımaktadır. Radyasyonun da dahil olduğu

çoğu kemoterapötik ajanın apoptozisi indüklediği bilinmektedir (Ojeda vd., 1994; Kerr ve Winterford, 1994; Dunn vd., 1997). Apoptozisi baskılamak, hücre kaybını azaltarak kanser hücrelerine bir avantaj sağlar (Rashed ve Ragap, 2004; Abdi vd., 2013). Kemoterapi ve radyoterapiye karşı, tümör hücreleri hayatta kalım proteinlerinin üretimini artırır. Bu proteinler apoptozisi baskılayarak hücrelerin ölümden korunmasını sağlarlar (Wang vd., 1996). İlaçlara dirençli tümör hücreleri, ilacın hücreden atılmasını sağlamakla ilaç aracılı apoptozisten kaçıp metastaz yaparak tüm vücuda yayılmaktadır. Böylece kemoterapi ve radyoterapinin gerçekleştirdiği tümör hücrelerinin ölümü büyük ölçüde apoptozisin aktivasyonu ile gerçekleşir ve apoptozisin engellenmesi antitümör tedavisine karşı tümör hücrelerinin dirençli hale gelmesine sebep olabilir (Solay vd., 2000).

Apoptozis, ya hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile (extrinsic pathway) ya da öncelikle mitokondride gelişen bir dizi hücre içi olaylarla (intrinsic pathway) başlatılabilir (Şekil 2.24.). FAS ve TNF ligandları veya Bcl-2 aile üyelerinin değişen oranlarıyla apoptozis gerçekleşir. Bcl-2 ailesi proteinleri kendi aralarında homo veya hetero-dimerler oluştururlar. Hücrenin yaşayabilirlik durumu bu ailenin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin rölatif oranına bağlıdır. Bu heterodimerlerden biri olan Bcl-2/Bax oranı bazı hematolojik kanserlerde prognostik markır olarak görülmektedir. Çünkü oranın artması ya da azalması apoptozisin inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanır (Miyoshito vd., 1994).

Myeloma hücreleri FAS, TNF ilişkili ligandları veya Bcl-2/Bax oranını değiştirerek apoptozisi indükler. Apoptozisten yoksun myeloma hücreleri antiapoptotik faktörlerin (bcl-xL, mcl-1, bcl-2) düzenlenmesinin artışıyla, apoptozis inhibitörlerini upregüle eder ve apoptozis indükleyen FAS ve TNF ligandlarına karşı direnç kazanır (Mitsiades vd., 2001; Spets vd., 2002). MM hücrelerinde bortezomib tedavisini takiben Bcl-2 ve Bax düzenlenmesinde değişiklikler olduğu bulunmuştur (Mitsiades vd., 2002).



Şekil 2.24. Apoptozis mekanizması (Kapse-Mistry vd., 2014).

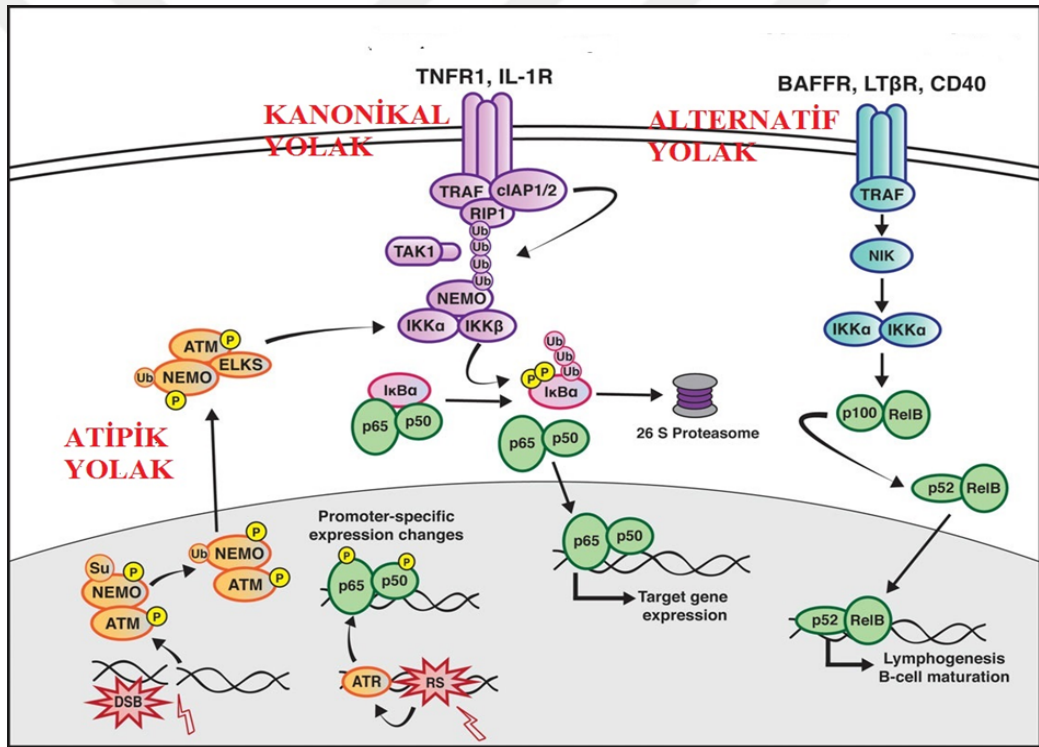
2.4.5 Sinyal Yolaklarındaki Değişiklikler

Sinyal yollarında meydana gelen değişiklikler kanser hücresindeki ilaç direncine katkıda bulunur. Dirençli hücrelerde çoğu durumda sinyal, mutasyonlu bir onkogen vasıtasıyla sinyal akışının proliferasyon, apoptozisin baskılanması ve ilaç direnci oluşumuna yönlendirilmesini sağlar. Bunlar RAS, EGFR, BCR-ABL gibi onkogenlerde gerçekleşebilir. Bu değişiklikler tümörün kendine özgü bir moleküler yolağa veya sinyalleşme sistemine dayanmasına sebep olur. Bu durum ‘onkogen bağımlılığı’ olarak adlandırılır ve tümör hücresinin sağkalımı için mutasyonla kazanılmış en az bir fonksiyon gerektirdiğini öngörür (Garraway ve Janne, 2012). Bu şekildeki hücreler kanser kök hücreleri gibi davranarak kendini yenileme, farklılaşma ve nispeten sessiz kalma kapasitesiyle kemoterapötik ilaçların etkilerinden kaçarak dirençli hücre haline gelir (Tan vd., 2010; Cairo vd., 2010).

2.4.5.1 NF-KB Aktivitesi

NF-KB, DNA bağlama özgüllükleri ve transkripsiyonel aktivasyon potansiyeline göre değişen sabit homo ve heterodimerik kompleksler oluşturabilen bir multigen proteinler ailesi olarak tanımlanır (Fuchs, 2013). NF-KB aktivasyonu hücre döngüsü genlerinin ifadesiyle kanseri, apoptozis inhibitörlerini, invaziv proteazlar gibi işlemleri yürütür (Karin, 2006). NF-KB sinyal yolağının aktivasyonu temelde kanonikal, alternatif ve atipik yolak olmak üzere üç şekilde gerçekleşir. Çoğu

araştırmada özellikle kanonik yol üzerine çalışılmıştır (Perkins, 2007). Kanonik yol, p50:p65:I-KB kompleksindeki I-KB, proteozom tarafından degradasyon için ubiquitinlenerek nükleusun içine ve dışına mekik dokuyabilir (Şekil 2.25.) (Gosh ve Karin, 2002). Proteozomdan bağımsız alternatif yolakda p100 fosforillenmesi ve yıkımıyla oluşan p52, RelB ile dimer oluşturarak gen ifadesini tetikleyeceği nükleusa transloke olabilir (Şekil 2.25.) (Bohuslav vd., 2004; Sasaki vd., 2005; Qin vd., 2006; Yao vd., 2007; Huang vd., 2007). Kanonik yol daha genel olup doğuştan gelen bağışıklık ve inflamasyon ile doğrudan ilişkilidir, alternatif yol ise ikincil lenfoid organların üretimi için B-hücre olgunlaşması ve sağkalımı için gereklidir (Bonizzi ve Karin, 2004). Atipik aktivasyon yolları ise DNA hasarına neden olan ajanlar, antikanser ilaçlar, hipoksi koşulları ve ultraviyole sonucunda aktive olur.



Şekil 2.25. NF-KB sinyal yolları (Cahill vd., 2016).

NF-KB'nin aktivasyonu MM gibi çoğu malign tümörde karakteristiktir (Annunziata vd., 2007; Keats vd., 2007). Kanser hücreleri ilacın indüklediği apoptozisi, sağkalım faktörlerini aktive ederek önleyebilir. Bu şekilde ilaca direnç kazanan hücrelerde NF-KB anahtar rol oynar. NF-KB, hücreleri ilacın indüklediği apoptozisten koruyan genlerin ifadesine izin verir, böylelikle kemoterapinin etkinliğini azaltır (Cusack, 2003). Bir araştırmada farklı ilaçlara NF-KB cevabının tek hücre hattında bile büyük

bir heterojenite gösterdiği rapor edilmiştir (Campbell vd., 2006). MM patogenezi NF-KB yolağının katkısı, TNF- α , TRAIL, BAFF ve CD40L'nin etkilerini içeren çoğunlukla ligand bağımlı aktivasyondur (Anderson ve Carrasco, 2011). NF-KB, sitokinlerin (IL-6 ve VEGF), hücre adhezyon moleküllerinin (ICAM-1 ve VCAM-1) ve hücre büyüme ve yaşam faktörlerinin (Bcl-2 ve IAP aile üyeleri) ifadesine yol açar (Wang vd., 1998; Chen vd., 2000). Bu proteinler aslında myeloma hücrelerinin patogenezi ve yaşamı için temel önemdedir (Ogata vd., 1997; Chauhan vd., 1997a; Hideshima vd., 2001). İfade edilen hücre adhezyon molekülleri kemik iliğinde stromal hücrelerle etkileşimle karşı karşıya kalır, bu da myeloma hücrelerinde hücre proliferasyonu ve kemorezistansı sağlayan bir sağkalım uyarandır (Palombella vd., 1998; Hideshima vd., 2001). NF-KB yolağındaki yapısal aktivasyon genlerinin mutasyonları, MM hücrelerini kemik iliği mikro çevresinin korumasına daha az bağımlı ve kemoterapiye daha dayanıklı yapar (Keats vd., 2007; Annunziata vd., 2007; Chapman vd., 2011).

Hastalardan izole edilen myeloma hücreleri yapısal olarak aktif NF-KB'ye sahip olması ve NF-KB aktivasyonunun önlenmesinin apoptozise yol açması NF-KB'nin transkripsiyonel hedeflerinin myeloma hücrelerinin yaşamı için gerekli olduğunu düşündürmektedir (Ni vd., 2001). NF-KB aktivasyonunun proteozoma bağlı yolağı proteozom inhibitörleriyle engellenebilir (Dolcet vd., 2006). Bu sayede proteozom inhibisyonu NF-KB'nin engellenmesine ve kanser hücresinin ölümüne yol açar. Bortezomib tedavisine cevap veren myeloma hücreleriyle muamele edilen fare ksenografileri: uzatılmış sağkalım, tümör büyüme inhibisyonu ve azalan tümör kılcaldamar yoğunluğu göstermiştir (Cusack, 2003). Bu durum bortezomibin NF-KB'nin kanonik yolağını engelleyerek apoptotik fonksiyonunu gerçekleştirdiğini gösterse de non-kanonik yolağı indükleyerek myeloma hücrelerini bortezomibe karşı daha az sorumlu yapar (Fabre vd., 2012). Böylece myeloma hücreleri bortezomib dirençli NF-KB fenotipi geliştirebilir (Markovina vd., 2008). NF-KB aktivasyonunun önlenmesi atipik yolak üzerinden de DNA hasarı oluşturarak sonuçta myeloma hücreleri tarafından çok sayıda sağkalım mekanizmasının çalıştırılmasını sağlayabilir.

2.4.5.2 Kemik İliği Mikroçevresinin Rolü

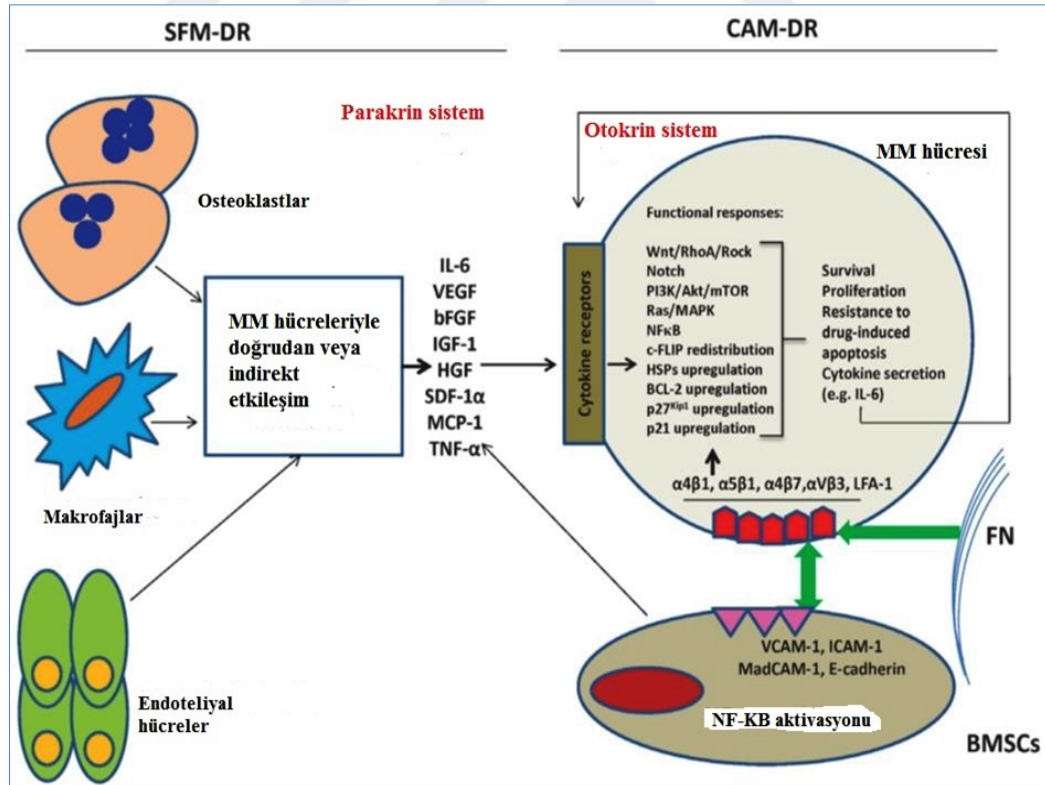
Myeloma hücreleri kemik iliği mikroçevresinde büyük genetik düzenlemeler kazanır ve bunlar hastalığın stromadan bağımsız ve kemoterapiye dirençli hale dönüşmesine yol açar (Hallek vd., 1998). Bu hücreler etrafındaki ekstraselüler matriks (ECM), sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörlerini içeren kemik iliği (BM) bileşiminin, BTZ dirençliliği ile ilgili olduğu artan kanıtlarla vurgulanmaktadır. Bortezomib, anti-myeloma aktivitesini myeloma hücrelerinin ECM proteinlerine ve stromal hücrelere bağlanmasını önleyerek gösterir. MM'de kemik iliği mikro çevresi etkisiyle ilaç direncini en iyi açıklayan mekanizmalar aslında kanserde çevre aracılı ilaç direncinin iki formu olup: çözünabilir faktör aracılı ilaç direnci (SFM-DR) ve hücre adezyon aracılı ilaç direnci (CAM-DR)'dir (Şekil 2.26.) (Meads vd., 2009). SFM-DR ve CAM-DR'nin myeloma hücrelerinde farklı mekanizmalar aracılığıyla ilaç direncini tercih ettiği düşünülmektedir (Nefedova vd., 2003).

CAM-DR, myeloma hücrelerini kemik iliği stromal hücreleri veya ekstraselüler matriks proteinlerine adhezyonuna yönlendirmesiyle gerçekleşir. Büyük ölçüde CAM-DR mekanizması nedeniyle ortaya çıkan ilaçlara doğuştan direnç bazı MM hastalarında gözlenebilir ve tedavi sırasında edinilmiş ilaç direncinin ortaya çıkmasına katkı sağlayabilir (Shain ve Dalton, 2001). Adhezyon moleküllerini yüksek ifade eden MM öncül hücreleri ilaç dirençli olup tedavi boyunca ilaç direnci edinmek için CAM-DR'nin katkısıyla seçilmiş olduğuna inanılır (Schmidmaier vd., 2006). Bu bulgular olağanüstü bir transkriptom değişikliğiyle oluşan edinilmiş ilaç direncine bakarak doğuştan ilaç direncinin en çok posttranskripsiyonel mekanizmalarla düzenlendiğini gösterir (Abdi, 2013).

SFM-DR, myeloma hücrelerinde en kritik büyüme ve yaşam faktörü olan IL-6 ilgisi ile daha iyi açıklanabilir. IL-6, myeloma hücrelerinde açıkça en iyi çalışılmış sitokindir (Hardin vd., 1994; Lichtenstein vd., 1995; Chauhan vd., 1997b) çünkü IL-6 salgılanması myeloma hücrelerinde BTZ dirençliliğine yol açar (Hao vd., 2011). Ekstraselüler matriksdeki temel eleman fibronektindir. Myeloma hücrelerinin integrin molekülleri aracılığıyla kemik iliği stromal hücreleri ve fibronektine adhezyonu hücre proliferasyonu, anti-apoptozis, ilaç dirençliliği, IL-6 salgısı ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin upregülasyonunu içeren çeşitli sinyal yollarını tetikler (Chauhan vd., 1996; Gupta vd., 2001; Shain vd., 2009). Ayrıca myeloma

hücreleri kemik iliği stromal hücrelerinden salınan IL-8 ile NF-KB indüklemeli bortezomib direnci göstermiştir (Markovina vd., 2010).

Myeloma hücrelerinin kemik iliği stromal hücreleri ve ekstraselüler matriks proteinleri arasındaki etkileşimi büyüme faktörlerinin, sitokinlerin, ekzozomların salgılanmasını sağlayarak MM patogenezi ve ilaç dirençliliğinde önemli bir rol oynar (Podar vd., 2009). Myeloma hücrelerinde büyüme faktörü olan IGF-1, plazma hücreleri tarafından üretilip kemik iliği mikroçevresine salınır burada MAPK ve PI3K/Akt sinyal yollarını aktive ederek myeloma hücrelerindeki proliferasyon ve ilaç dirençliliğini yönetir (Hideshima vd., 2007; Podar vd., 2009; Sprynski vd., 2009; Kuhn vd., 2012). Kemik iliği stromal hücreleri kökenli ekzozomlar, BTZ indüklemeli hücre ölümünü kaspaz-9, kaspaz-3 ve PARP kesimini indükleyerek myeloma hücrelerini apoptozisten korumak için durdurur (Wang vd., 2014). Bu durum SFM-DR ve CAM-DR'nin kemik iliğinde genellikle birlikte çalıştığının göstergesidir.



Şekil 2.26. MM’de kemik iliği mikro çevresi etkisiyle gerçekleşen ilaç direnci mekanizmaları (Abdi vd., 2013).

Bunların dışında MARCKS hücre adezyonunda, yayılma ve istilada önemli rol oynayan bir proteindir ve son zamanlarda metastazda da rol oynadığı düşünülmektedir (Finlayson ve Freeman, 2009; Chen ve Rotenberg, 2010). MARCKS proteininin BTZ dirençli MM hücre hattı ve MM klinik örneklerinde diğer hasta örneklerine kıyasla daha yüksek ifade edildiği, öte yandan fosforilasyonunun inhibisyonu hücre hattı ve hayvan modelini BTZ'e hassaslaştırdığı bulunmuştur (Yang vd., 2014).

2.4.6 Sitogenetik ve Epigenetik Değişiklikler

MM hastaları karyotip değişikliklerine göre 48-75 kromozoma sahip hiperdiploid (tek numaralı kromozomlar 3,5,7,9,11,15,19,21) ve 45'ten az veya 75'ten fazla kromozoma sahip non-hiperdiploid, IgH translokasyonları veya del(13) gibi kromozomal delesyonlar gösterir (Fonseca vd., 2009). MM genomu karasızlığında aşırı artan homolog rekombinasyonun, MM'in agresifliğine ve ilaç direncine katkısı temel mekanizma olarak tanımlanır (Shammas vd., 2009). P53 gen mutasyonları MM hastalığının sonraki basamaklarında ilaç direnciyle ilişki içerisinde ortaya çıkmaktadır (Avet-Loiseau vd., 2007b; Xiong vd., 2008; Reece vd., 2009; Jiang vd., 2012). Monoklonal gamopati (MGUS), MM'le kıyaslandığında c-Myc neredeyse tespit edilmemiştir (Greil vd., 1991; Chng vd., 2011), ve onun da MM'de ilaç direnciyle ilişkisi açık değildir (Greco vd., 2006).

MM hastalarında epigenetik değişiklikler ve BTZ cevap profili arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmada bütün örneklerde evrensel metilasyon durumunun yüksek olduğunu ve bortezomib tedavisini takiben metillenmemiş DNA'lı hastaların daha yüksek genel sağkalıma sahip olduklarını bulunmuştur. Gene özgül metilasyonda NF-KB1 ve CXCR4 (kemokin reseptörü) metillenmesi düşük frekanstaki hastaların daha yüksek genel sağkalıma sahip olduğu bulunmuştur (Heuck vd., 2013). Kanserde histon modifikasyonlarının rolü de bilinmektedir fakat, MM patogenezi kromatin değişimi rolünü destekleyecek yeterli kanıtı hala sahip değildir. Histon deasetilaz inhibitörleri (HDACi) yalnız veya kemoterapötik ilaçlarla in vitro ve in vivo değerlendirmelerde kombine edildiğinde her zaman iyi anti myeloma aktivitesi göstermiştir (Maiso vd., 2006; Smith vd., 2010; Richardson vd., 2013; Maes vd., 2013; Hajek vd., 2014).

2.4.7 İlaç Hedeflerindeki Değişiklikler

Proteozom inhibitörlerinin etkinliği, hastalığın gelişimindeki dirençlilikle sınırlıdır (Egan vd., 2016). Dirençlilik, azalan ubiquitin proteozom sistemiyle bağlantılı olup hücrenin bu stresin üstesinden gelmesine izin veren otofaji, deubikitinasyon ve şaperon proteinleri mekanizmalarında bozulmalar olduğunun göstergesidir (Nikesitch ve Ling, 2016).

2.4.7.1 Proteozomun $\beta 5$ Altünitesindeki Nokta Mutasyonları

MM'de proteozom inhibitör direnci biyolojisi, anlaşılmaya çalışılan klinik bir problemdir. Bilgisayar yardımıyla yapılan yapısal modellemelerde PSMB5 genindeki nokta mutasyonlarının proteozomun $\beta 5$ altünitesi bağlanma bölgesinde değişikliğe neden olduğu gösterilmiş ve bu durumun bortezomib dirençliliğine yol açtığı ortaya çıkarılmıştır (Groll vd., 2006; Lü vd., 2008b; Suzuki vd., 2011; Franke vd., 2012). Bu bilgiler $\beta 1$ ve $\beta 2$ altünitelerinde veya immünoproteozom eşleniklerinde hiçbir mutasyon bulunmamasına rağmen $\beta 5$ altünitesinin proteozom inhibitörlerini dirençliliğe yönlendirmede anahtar belirleyici olduğunun altını çizerek (Ri vd., 2010; Franke vd., 2012; Niewerth vd., 2014a). Tabii ki tüm dirençlilik mekanizmasından sadece $\beta 5$ altünitesinde meydana gelen bir mutasyon sorumlu olmayacaktır. Bu kavrama destek olarak ALL'li veya MM'li T hücre hatları mutant PSMB5 ile transfekte edildiğinde kısmi bir direnç göstermiştir (Lü vd., 2008b; Ri vd., 2010). Proteozomun $\beta 5$ aktivitesi BTZ ve CFZ için olduğu kadar klinik gelişmede olan ve $\beta 5$ 'i hedef alarak tasarlanmış bütün proteozom inhibitörleri için de önemlidir (Berkers vd., 2005; Demo vd., 2007; Moreau vd., 2011, 2012; Huber ve Groll, 2012).

Proteozom inhibe eden ilaçlara devamlı maruz bırakılarak in vitro olarak üretilen proteozom inhibitörlerine dirençli hücre hatları proteozom inhibitör dirençliliğini anlamak ve üstesinden gelmek için model oluşturur (Ruckrich vd., 2009; Franke vd., 2012; Tornatore vd., 2014; Huber vd., 2015). BTZ dirençli birçok hücre hattı modelleri proteozomun $\beta 5$ altünitesinde mutasyonludur ve bu mutasyon PSMB5 genindeki S1 BTZ bağlanma bölgesinde kümelenmiştir (Oerlemans vd., 2008; Lü vd., 2008b, 2009; Ri vd., 2010; Franke vd., 2012; Verbrugge vd., 2012). PSMB5 gen mutasyonu, 40-80 kat BTZ dirençli hücre hatlarında görüldüğü gibi bu mutasyonun yokluğunda da çok yüksek seviye dirençlilik gözlemlenmiştir (Pérez-Galán vd.,

2011; Balsas vd., 2012). Bu uyumsuzluklar BTZ konsantrasyonlarına maruziyetteki farklılıklarla ilişkili olabilir. Fakat proteozom inhibitör terapisine dirençli hastalardan köken alan MM hücrelerinin kapsamlı analizinde PSMB5 mutasyonları bulunamamıştır (Lichter vd., 2012). BTZ dirençli hücre hatlarında $\beta 5$ mutasyonlarının yüksek frekansı ve BTZ dirençli hastalardan alınan örneklerdeki yokluğu henüz çözülememiş bir çelişkidir (Wang vd., 2008; Lü vd., 2011; Chapman vd., 2011; Lichter vd., 2012; Pérez-Galán vd., 2011).

Bütün tümör hücre hatları $\beta 5$ mutasyonlarını uzun süre BTZ'e maruziyetle ve aylar süren çoklu tedaviler sonrasında edinmektedir. İkinci olarak BTZ seçiliminin ardından farklı hücre hatlarında direnç edinimi için gereken zamanda farklılıklar vardır. Bazı hücre hatları BTZ direncini birkaç ayda edinirken diğerleri için daha uzun bir periyot gereklidir (Franke vd., 2012). Birçok laboratuvarında BTZ dirençli hücre hatlarının seçim protokolleri için kullanılan doz programları ve ilaçsız aralıklar farklıdır. Araştırmalarda farklı PSMB5 mutasyonlarının farklı seviyelerde BTZ dirençliliğine sebep olduğu ve BTZ ile seçici baskı nedeniyle bir mutasyon kayması, daha da uzun süreli kültürde ikinci bir mutasyon daha ortaya çıktığı gözlemlenmiştir (Lü vd., 2009; Franke vd., 2012). Bu bulgular belirli mutasyonların diğer mutasyonlardan daha yüksek bir BTZ dirençliliği sağladığını göstermektedir (Niewerth vd., 2015). Bundan dolayı ilaç dirençliliğiyle ilişkili $\beta 5$ mutasyonlarının ardışık tedavilerin geç evresinde ortaya çıktığı düşünülebilir.

BTZ dirençliliğiyle ilgili $\beta 5$ mutasyonlarının bir diğeri sucül bir bakteri olan *S.tropica* sayesinde oluşmuştur. Bu canlı proteozom inhibitörü Salinosporamide A'yı üretirken aynı zamanda Salinosporamide A'ya 30 kat dirençlidir. Çünkü BTZ dirençli hücre hatlarında da yaygın olarak görülen mutasyonları barındıran β altünitelerinin regülasyonunu arttırarak Salinosporamide A'ya karşı bir kendini koruma mekanizmasıyla donatılmıştır (Kale vd., 2011). Salinosporamide A'ya edinilmiş dirençli insan lösemik hücreleri de, *S.tropica*'da doğal gerçekleşenlere benzer $\beta 5$ mutasyonları tanımlanmıştır (Niewerth vd., 2014a). Bu gözlemler proteozomlardaki $\beta 5$ mutasyonlarının, proteozom inhibitörlerine doğal dirençlilik sağlayan evrimsel bir kökeni olduğunu göstermektedir (Kale vd., 2011).

Nokta mutasyonlarının dışında çalışmalar proteozom altünite genlerindeki polimorfik varyasyonların proteozom inhibitör dirençliliği ile ilgili olup olmadığına

odaklanmıştır (Gomes, 2013). PSMB5 genindeki polimorfizmler üzerine yapılan çalışmalar proteozom aktivasyonu veya proteozom inhibitörlerine hassasiyette herhangi bir etkisi yoktur (Wang vd., 2008; Suzuki vd., 2011; Lichter vd., 2012). Bu polimorfizmler pre ve post tedavi örneklerinde bulunduğundan PSMB5 polimorfizmlerinin BTZ tedavisi boyunca seçici baskıdan oluşmadığını göstermektedir.

2.4.7.2 Proteozomun $\beta 5i$ Altünitesindeki Nokta Mutasyonları

Proteozom homeostasisindeki düzenleme için hematolojik hastalıklardaki yapısal proteozom ve immünoproteozom montajının arasındaki belirli denge mekanizmasını çözmek çok önemlidir. Tümör hücreleri immünoproteozom fonksiyonunu immün gözetimden kaçmak için yönlendirme kapasitesine sahiptir (Johnsen vd., 1998). $\beta 5i$ immünoproteozomların olgunlaşması için $\beta 1i$ ve $\beta 2i$ altünitelerinin birleşmesi ve işlenmesinden sorumluyken PSMB8 mutantlarındaki immünoproteozom montajı gecikebilir (Murata vd., 2009; Kincaid vd., 2012). BTZ dirençli hücre immünoproteozom seviyesini düşürerek yüksek bir ilaç direnç fenotipine ulaşabilir. PSMB8 genindeki mutasyonun immünoproteozom montajını etkilediği gösterilmiştir bundan dolayı PSMB8 ifadesinde bir düşüşe ve aşırı proteozom fonksiyonuna neden olur (Suzuki vd., 2011; Arima vd., 2011; Kitamura vd., 2011). Bu PSMB8 gen ifadesinin aşırılığı $\beta 5i$ 'nin tersiyer yapısını bozar ve kimotripsin benzeri aktiviteyi düşürür fakat $\beta 5i$ 'nin ifadesini değiştirmez (Agarwal vd., 2010). MM hastalarında PSMB8 Q49K (Gln49Lys) polimorfizminin ön tedavi örneklerinde BTZ tedavisi sonrası örneklerinden daha yaygın olduğu fakat BTZ cevabıyla ilişkili olmadığı bulunmuştur (Lichter vd., 2012).

2.4.7.3 Proteozom Altünitelerinin İfadesindeki Değişimler

Yapılan çalışmalar proteozom inhibitörlerine uzun süre maruziyetin $\beta 1$ veya $\beta 5$ altünitelerinin yüksek ifadesi, artan proteozom aktivitesi ve artan hücre yaşamıyla sonuçlandığını göstermiştir (Chondrogianni vd., 2003, 2005). Proteozom $\beta 5$ altünitelerinin aşırı ifadesi BTZ direnci edinmiş hematolojik hücre hatlarında en yaygın düzenleme olarak bulunmuş (Kraus vd., 2007; Kuhn vd., 2012; Niewerth vd., 2014a,b,c;), bununla beraber immünoproteozom altünitelerinin ifadesinde düşüş gözlemlenmiştir (Fuchs vd., 2008; Niewerth vd., 2014b; Oerlemans vd., 2008;

Leung-Hagesteijn vd., 2013). Bazı araştırmalar BTZ dirençliliğinin yapısal proteozom ve immünoproteozom kompozisyonunda lösemik hücreler, lenfoid hücreler ve katı tümör hücrelerinde farklı etkileri olduğunu vurgulamaktadır (Suzuki vd., 2011; De Wilt vd., 2012; Verbrugge vd., 2013). Birçok çalışma da BTZ dirençli tümör hücre hatlarında POMP (Proteosom Maturation Protein) geninin artan ifadesinin rol oynadığını vurgular (Fuchs vd., 2008; Li vd., 2013). Özetle birçok çalışma $\beta 5$ altünitelerinin yüksek ifadesinin, uzun süre BTZ maruziyetini takiben, mutasyonlar edinilmeden önce gelebileceğini vurgular (Ruckrich vd., 2009; Franke vd., 2012; Niewerth vd., 2013).



3. MALZEME ve YÖNTEM

3.1 Hücre Kültürü

Kullanılan Madde ve Kimyasal Malzemeler: Multiple myeloma kanser hücre hatları KMS20 (bortezomibe dirençli) ve KMS28 (bortezomibe hassas) JCRB'den (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank) temin edilmiştir (Ek A., Ek B.). RPMI 1640 medium (Roswell Park Memorial Institute 1640), DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline), FBS (Fetal Bovine Serum) ve Penicillin-Streptomycin Life Technologies Incorporated'den, DMSO (Dimetil Sülfoksit) Santa Cruz Biotechnologies Incorporated'den temin edilmiştir.

3.1.1 Hücre Kültürünün Yapılışı

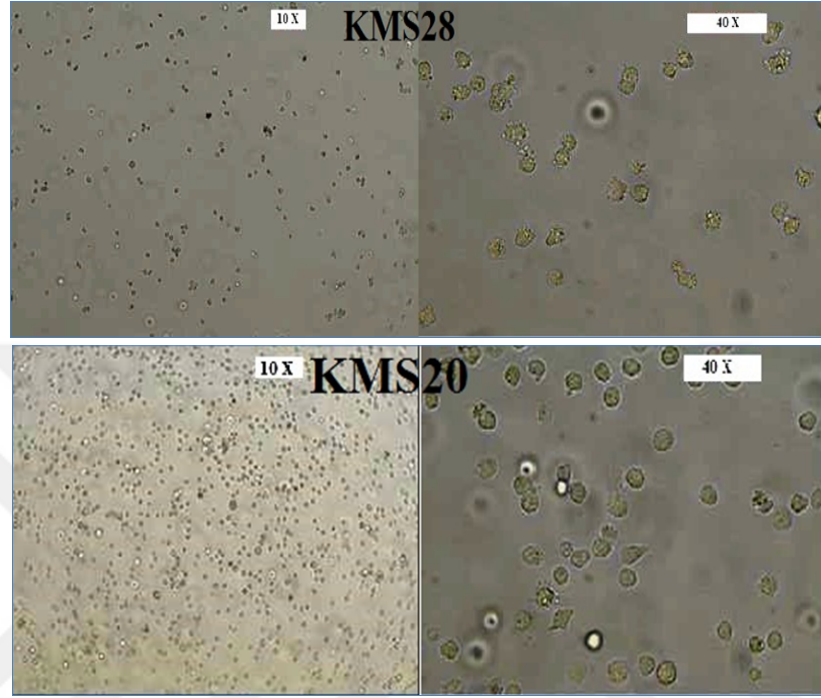
Hücre kültürü ortamını hazırlamak için RPMI 1640'tan 44,5 ml 50 ml'lik bir falkona koyularak daha sonra üzerine 5 ml FBS ve son olarak 500 µl antibiyotik eklenip karıştırılmıştır. Daha sonra soğuk zincirle elimize ulaşan multiple myeloma hücre hatları çözülmesi için 15 ml'lik falkonlara alınarak üzerine 10 ml RPMI 1640 eklenmiş ve 800 rcf'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Bu sayede hücreler dondurulurken kullanılan DMSO'dan temizlenmiştir. Süpernatant dökülerek üzerine 5 ml hazırlanan besiyerinden konulmuştur. Hücre sayıları henüz daha az olduğu için 25 cm²'lik flakslara ekim yapılmıştır. Hücre hatları hazırlanan besiyeri içerisinde, %5 CO₂ ve 37°C sıcaklıktaki etüvde steril şartlarda inkübe edilerek çoğaltılmıştır.

İnkübe edilen hücrelerin kültür ortamı her gün kontrol edilerek gerektiğinde değiştirilmiştir. Bunun için hücreler ilk önce 15 ml'lik falkonlara alınmış ve 800 rcf de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant dökülmüştür. Yıkama işlemi için 5 ml DPBS ile pipetaj yapılarak ardından santrifüj edilmiş ve süpernatant dökülmüştür. 25 cm²'lik flakslara ekim için 5 ml, 75 cm²'lik flakslara ekim için 15 ml besiyeri eklenerek besiyeri değişimi işlemi yapılmıştır.

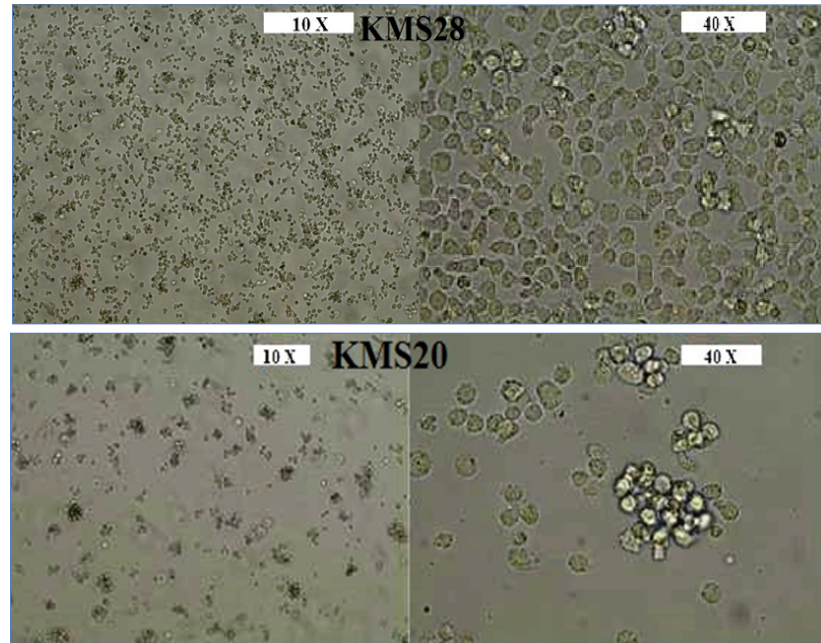
3.1.2 Hücrelerin Pasajlanması

Üremekte olan hücre hatları %80 doygunluğa ulaşınca pasajlanmıştır (Şekil 3.1., Şekil 3.2.). Bu amaçla flaksların içerisindeki hücreler ve besiyeri pipetle alınarak 15 ml'lik falkonlara konulmuştur. 800 rcf'de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant

uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine 5 ml DPBS eklenerek yıkanmış, santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Bu aşamada hücre sayımı yapılmış ve hücre sayısına uygun bir flaks hazırlanmıştır. Hücreler besiyeri ile muamele edilerek 75 cm²'lik flaksa ekilmiş ve 37 °C'de %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir.



Şekil 3.1. Hücre hatlarının ışık mikroskobu altındaki 1. gün görüntüsü.

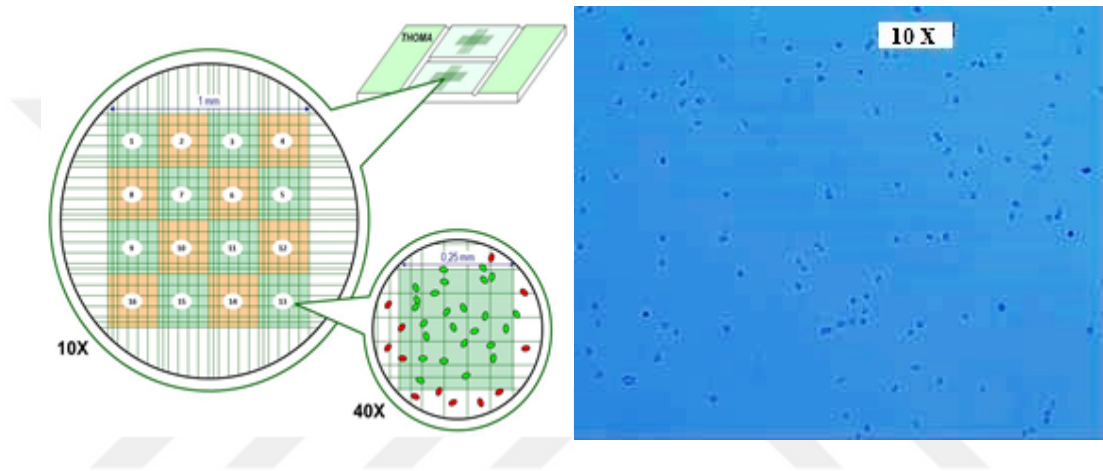


Şekil 3.2. Hücre hatlarının ışık mikroskobu altındaki 20. gün görüntüsü.

3.1.3 Hücre Sayılarının Hesaplanması

10 ml besiyerinde sulandırılan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak endorff tüpe konulmuş ve üzerine 10 µl tripan mavisini eklenerek karıştırılmıştır. Bu karışımdan Thoma lamının iki bölmesine de 10 µl konularak üzerine lamel kapatılmıştır (Şekil 3.3.). Thoma lamının her iki tarafındaki hücreler sayılarak toplam ve bu toplam ikiye bölünmüştür. Hücre sayıları (3.1)'deki formüle göre belirlenmiştir.

$$\text{Hücre sayısı} = \frac{\text{iki bölmedeki toplam hücre}}{2} \times \text{sulandırma faktörü} \times 10^4 \quad (3.1)$$



Şekil 3.3. Thoma lamında KMS20 hücre hattı hücrelerinin sayımı.

3.1.4 Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Yapılan hücre kültürü işleminin ardından daha sonra kullanılmak üzere saklanması amacıyla hücrelerin bir kısmı dondurulmuştur. Bu işlem için öncelikle hücreler besiyerinden arınması için yıkanmış ardından hücre sayımı yapılmıştır. En az 2.000.000 hücre bir kryovial tüpte dondurulacak şekilde hesaplama yapılmıştır. Çünkü daha fazla sayıda hücre konulması durumunda dondurma esnasında sıvı hacimce genişleyerek tüpten sızıntıların olmasına sebep olabilir. Her bir kryovial tüp 1,5 ml hacmi alabilir, hücreler bu miktara göre ayarlanan %70 FBS, %20 RPMI 1640 ve %10 DMSO içeren dondurma ortamında dondurulmuştur. Pellet üzerine öncelikle RPMI 1640 konularak daha sonra yavaşça FBS eklenmiş ve son olarak da DMSO ile yavaş bir şekilde karıştırılmıştır. Bir gece -20 °C buzdolabında bekletildikten sonra -80 °C dondurucuya alınmıştır. Daha sonra çok daha uzun süre muhafaza edebilmek için sıvı azota yerleştirilmiştir.

3.2 Hücre Proliferasyon Analizi

Kullanılan Kimyasal Malzemeler: MTT [3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid] ve DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) Life Technologies Incorporated'den, DMSO (Dimetil Sülfoksit) Santa Cruz Biotechnologies Incorporated'den, Bortezomib [(3,5mg), Velcade, PS-341] Millenium Pharmaceuticals Incorporated'den temin edilmiştir.

3.2.1 Bortezomib Dozunun Belirlenmesi

Multiple myeloma kanser hücre hatları KMS20 ve KMS28 üzerinde, multiple myelomaya karşı antikanser ilaç olarak kullanılan bortezomibin sitotoksik etkileri incelenmiştir. Bunun için öncelikle bortezomibin çözünmesi ve uygun miktarlarda stoklanması gerekmektedir. Her hücre hattına IC₅₀ değerlerinin hesaplanabilmesi için farklı konsantrasyonlarda bortezomib uygulanmıştır.

- KMS28 (bortezomibe hassas) hücre hattı için 1; 5; 7,5; 10; 20; 30; 50; 75 ve 100nM konsantrasyonlarda,
- KMS20 (bortezomibe dirençli) için ise 1; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5; 20; 30; 50 ve 100nM konsantrasyonlarda bortezomib uygulanmıştır.

3.2.2 MTT Testi

MTT testi, formazon boyalarının ya da MTT azalmasına bağlı olarak enzimatik aktivitenin kolorimetrik ölçümüne dayanan hücre çoğalma miktarının tespit edildiği bir yöntemdir. Bu yöntemle kullanılacak olan herhangi bir tıropatik ajanın hücre üzerindeki sitotoksik ya da proliferatif etkileri belirlenebilmektedir.

Yöntem MTT ajanı ile inkübe edilen hücrelerde meydana gelen renk değişiminin kolorimetrik olarak belirlenmesi prensibine dayanmaktadır. Oluşan renk değişikliği sarı ile renklendirilmiş formazon tuzlarının aktif hücre mitokondrilerinde tetrazolyum tuzunun azalması sonucunda oluşmaktadır. Bu bileşiklerin absorbans değeri metabolik olarak aktivitelerinin belirlenebilmesi ile orantılıdır.

MTT Çözeltisinin Hazırlanışı: 0,06 g MTT tartılarak 15 ml'lik falkona alınmış üzerine 12 ml DPBS eklenmiş ve partikül kalmayana kadar karıştırılmıştır. Daha

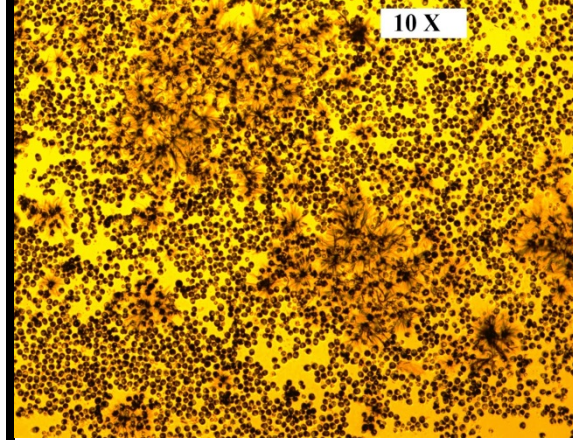
sonra filtreden geçirilip etiketlenerek alimünyum folyo ile kaplanmış ve ışıktan korunması sağlanmıştır. +4 °C de buzdolabında saklanmıştır.

MTT Testinin Yapılışı:

1. gün: Hücreler besiyerinin uzaklaştırılmasının ardından DPBS eklenerek yıkanmış ve bu esnada hücre sayımı yapılmıştır. 96 kuyucuklu plak için 1.000.000 hücre gerekmektedir. Bu sayıdaki hücre ayrı bir 15 ml'lik falkona alınmış ve üzeri besiyeri ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. Plagın 1. kuyusuna sadece 100 µl besiyeri ve tüm diğer kuyulara 100 µl besiyeri+hücre karışımından ekilmiştir. Sadece besiyeri ekilen kuyular daha sonraki hesaplamalarda kontrol amaçlı kullanılmıştır. Çalışma şekline göre ilk veya son kuyular boş bırakılabilir, çünkü genellikle bu kuyularda daha fazla buharlaşma olmaktadır. Plagın üzeri tarih ve saatiyle birlikte etiketlenmiştir. 24 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂ ayarlı inkübatörde bekletilerek hücrelerin çoğalması sağlanmıştır. Hücre membran proteinleri ve büyüme faktörlerinin yeniden sentezlenebilmesi için 24 saatlik bu süre gerekmektedir. Ayrıca bu yolla besiyeri içerisindeki bortezomibin hücreyle muamelesinden önce hücrelerin metabolik aktivite kazanmaları da sağlanmış olmaktadır.

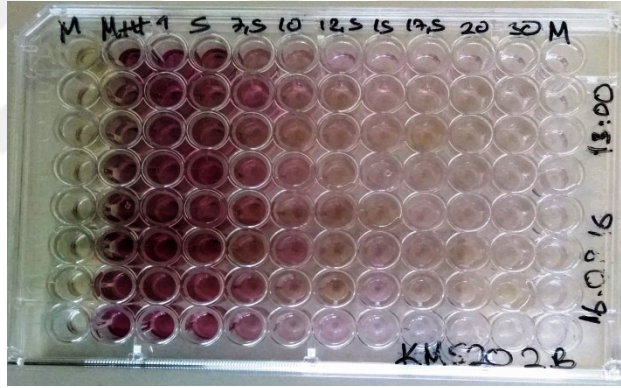
2. gün: 24 saat sonra daha önce stoklanmış olan 2 mM bortezomibden belirlenen konsantrasyonlar steril su ile sulandırılarak hazırlanmıştır. İkinci gün yapılması gereken işlem belirlenen bortezomib dozları+besiyerini 100 µl olacak şekilde her bir kuyucuk üzerine eklemektir. Fakat sadece ilk ve son kuyular kontrol amaçlı konulduğundan bunlara sadece 100 µl besiyeri eklenmiştir. Bu işlemin ardından deney tasarımına göre 24 saatlik bir çalışma yapılacaksa plak 24 saat, 48 saatlik bir çalışma yapılacaksa plak 48 saat 37°C ve %5 CO₂ ayarlı inkübatörde bekletilerek hücrelerin ilaçla birlikte çoğalması sağlanmıştır.

3 veya 4. gün: 96 plak kuyucuklarında bulunan 100 µl besiyeri ve hücre karışımı üzerine, hazırlanmış MTT çözeltisinden 20 µl ilave edilmiştir. Çözelti ilavesini takiben 96 plak inkübatörde 4 saat bekletilmiştir (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. MTT testi sonucu KMS28 hücre hattı üzerinde oluşan kristaller.

İnkübasyonun ardından plak 10 dk 1000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Hücrelerin yüzeyinde bulunan besiyeri pipet ile alınarak her kuyuya 100 µl DMSO ilave edilmiş ve 10 dk daha inkübatörde bekletilmiştir. Bu işlemde canlı hücrelerde MTT eklenmesiyle oluşan kristaller çözünerek mavi-mor renkte görünür (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. KMS20 hücre hattında 48 saat sonucu MTT ile oluşan renk değişimi.

İnkübasyonu yapılan hücrelerin, ChroMate marka ELISA okuyucu ile 492 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılmıştır. Her bir hücre hattına uygulanan 24 ve 48 saat süre için 3 bağımsız deneyin ortalaması alınmıştır. Microsoft Excel programı yardımı ile uygulanan bortezomib dozuna karşılık % hücre hayatta kalma eğrileri elde edilmiştir.

3.2.3 IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

KMS20 ve KMS28 hücre hatlarının 24 ve 48 saat içerisinde bortezomibe maruz bırakıldığında %50 oranında inhibe olduğu değer (IC₅₀) hesaplanmıştır. Bunun için

öncelikle uygulanan bortezomib dozununun 10 tabanında logaritması alınmış ve doza karşı ortalama hayatta kalma değerleri hesaplanmıştır. Bu veriler GraphPad Prism 7 programına aktararak doğrusal olmayan regresyon analizi sonucu IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

3.3 RNA İzolasyonu

3.3.1 RNA İzolasyonu İçin Hücre Ekimi

1. gün: Her bir hücre hattı için 24 ve 48 saat sürelerde 6'lık plaklara her bir kuyuya 1.000.000 hücre olacak şekilde 4 kuyu, 2 ml hücre ve besiyeri karışımı ekilmiştir. Bortezomib doz artışına bağlı olarak gen ifade farkı için plaklar her bir hücre hattının IC₅₀ değerinin altında ve üstünde olacak şekilde 3 farklı konsantrasyon ve kontrol grubu olarak ayrılmıştır. Bu değer aralıkları;

- KMS20 24 saat için 20; 25; 30 nM ve kontrol grubu,
- KMS20 48 saat için 5; 6; 7,5 nM ve kontrol grubu,
- KMS28 24 saat için 5; 6; 7,5 nM ve kontrol grubu,
- KMS28 48 saat için 3; 4; 5 nM ve kontrol grubudur.

Sabit bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat arasındaki gen ifade farkı için plaklar her iki hücre hattının IC₅₀ değer aralığını kapsayacak şekilde 2 farklı konsantrasyon ve kontrol grupları olarak ayrılmıştır. Bu değerler;

- KMS20 24 saat için 5; 25 nM ve kontrol grubu,
- KMS20 48 saat için 5; 25 nM ve kontrol grubu,
- KMS28 24 saat için 5; 25 nM ve kontrol grubu,
- KMS28 48 saat için 5; 25 nM ve kontrol grubudur.

Daha sonra plaklar etiketlenerek 37°C ve %5 CO₂ ayarlı inkübatörde bekletilerek hücrelerin çoğalması sağlanmıştır.

2. gün: Ertesi gün hücrelerin üzerine belirlenen dozlardaki bortezomib ve besiyeri karışımı 2 ml olacak şekilde eklenmiştir. Kontrol grubuna ise sadece 2 ml besiyeri ilave edilmiştir. 24 ve 48 saat inkübe edilen plaklarda RNA izolasyonu yapılmıştır.

3.3.2 RNA İzolasyonunun Yapılışı

Hücre hatlarından RNA izolasyonu, Thermo Fisher Scientific PureLink® RNA Mini Kit protokolüne göre yapılmıştır. Bu işlem için kullanılacak malzemelere ön hazırlık yapmak gerekmektedir. Öncelikle yıkama tamponu 2'ye 60 ml %100 etanol eklenmiştir. Liziz tamponu, 1 ml'ye 10 µl 2-Merkaptoetanol olacak şekilde toplamda 3000 µl hazırlanmıştır. %70'lik etanol ise 7 ml %100 etanolün üzerine 3 ml steril su konularak hazırlanmıştır.

Ön hazırlık işleminden sonra her bir grup hücre ayrı ayrı 15 ml'lik falkonlara alınarak 2000 rcf'de 5 dk iki kez santrifüj edilmiş ve ardından süpernatant dökülmüştür. Falkonların üzerine liziz tamponundan 600 µl eklenmiş ve pellet kalmayana kadar 5 dk vortekslenmiştir. Daha sonra %70'lik etanolden 700 µl her bir falkona eklenip tekrar 5 dk vortekslenmiştir. Bu aşamada hücre membranı liziz edilmiş ve RNA iplikleri görünür hale gelmiştir. Lizat 700 µl'yi aşmayacak şekilde kartuşlu tüplere alınmış ve 12.000 rcf'de 15 sn santrifüj edilerek alt kısımda toplanan sıvı dökülmüştür. Bu aşamada lizat içerisindeki RNA kartuşta toplanmaktadır. 700 µl yıkama tamponu 1 eklenip 12.000 rcf'de 15 sn santrifüj edilerek alt kısım dökülmüştür. Tüpler toplama tüpleriyle değiştirilmiş, 500 µl yıkama tamponu 2 eklenip 12.000 rcf'de 15 sn santrifüj edilerek alt kısım dökülmüştür. Aynı işlem bir kez daha tekrarlanmış ardından hiç bir şey eklenmeden 12.000 rcf'de 2 dk santrifüj edilerek alt kısım dökülmüştür. Bu kez alttaki tüpler saklama tüpleriyle değiştirilerek 50 µl RNAaz'dan arınmış su eklenmiş 1 dk oda sıcaklığında beklenmiştir. Hemen sonra 12.000 rcf'de 2 dk santrifüj edilmiş ve aynı işlemin bir kez daha tekrarlanmasının ardından RNA'lar saf olarak elde edilmiştir.

3.3.3 Nanodrop Ölçümü

Hücre hatlarından izole edilen RNA'ların konsantrasyonları, Thermo Fisher Scientific Nano Drop 2000 cihazıyla ölçülmüştür. Total RNA izolasyonunun miktarının ve saflığının belirlenmesi için 260, 280 ve 230 nm dalga boylarında absorbans ölçümü yapılır. RNA'ların saflığı 260 nm'deki absorbansın diğerlerine bölünmesi ile hesaplanır. İdeal bir RNA izolasyonunda 260/280 absorbans değeri 2,0 civarında olması gerekmektedir. Daha sonra bu konsantrasyonlara göre cDNA

sentezinde kullanılması gereken RNA miktarları (3.2)'deki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{RNA}(\mu\text{g/mL}) = 260 \text{ nm'deki absorbans} \times \text{Sulandırma faktörü} \times 40 \mu\text{g/mL} \quad (3.2)$$

3.3.4 Agaroz Jel Elektroforezi

İzole edilen RNA'lar, saflığının kontrolü için agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir. Bunun için öncelikle agaroz jel hazırlanmalıdır.

Agaroz Jel Hazırlanışı: %1'lik agaroz jelin hazırlanması için 0,6 g agaroz tartılarak bir beher içerisine alınmıştır. Üzerine 60 ml 10xTBE ve 1 µl etidyum bromür eklenmiştir. Karışım mikrodalga fırında yaklaşık 10 dk kaynatılmış ardından kabarcık kalmamasına dikkat edilerek jel tankına dökülmüştür. Tank üzerine uygun bir tarak yerleştirilerek jel soğumaya bırakılmış ve soğuduktan sonra elektroforez tankı 10xTBE ile doldurulmuştur. Daha sonra RNA örnekleri sırasıyla kuyucuklara yüklenerek 100 V'da 45 dk yürütülmüştür. Elektroforezin ardından jel UVITEC Cambridge görüntüleme cihazında UV ışığı altında görüntülenmiştir.

3.4 cDNA Sentezi

Thermo Fisher Scientific cDNA Reverse Transcription Kit protokolüne göre işlem basamakları gerçekleştirilmiştir. Her bir grup RNA'dan 1 µg olacak şekilde hesaplanan miktarlarda RNA alınarak üzeri steril su ile 10 µl'ye tamamlanmıştır. Daha sonra cDNA master mix hazırlama işlemine geçilmiştir. Bu işlem esnasında protokole uygun olarak tüm işlemler buz üzerinde yapılmış primer ve enzimin ışık görmemesi sağlanmıştır.

cDNA Master Mix Hazırlanışı: 4,2 µl RNAaz'dan arınmış su, 2 µl 10xRT tamponu, 2 µl random primer, 0,8 µl dNTP mix ve 1 µl reverse transkriptaz enzimi bir ependorfta karıştırılmıştır.

PCR tüplerinin herbirine önce 10 µl master mix daha sonra 10 µl örnek RNA'sı konularak karıştırılmıştır. Tüpler PCR cihazına yerleştirilerek amplifikasyon basamakları 1. basamak 25°C-10 dk, 2. basamak 37°C-120 dk, 3. basamak 85°C-5 dk ve soğuma 4°C olarak ayarlanmıştır. İki buçuk saatin ardından sentezlenen

cDNA'ların nanodropta konsantrasyon ölçümleri yapılarak uygun koşullarda saklanmıştır.

3.5 Gen İfade Analizi

3.5.1 Realtime Multipleks PCR

Kullanılan Primer Problar:

- ABCB1 (MDR-1) geni: TaqMan Gene Expression Assay Hs00184500_ m1 (FAM)
- ABCC1 (MRP-1) geni: TaqMan Gene Expression Assay Hs01561502_ m1 (FAM)
- ABCC2 (MRP-2) geni: TaqMan Gene Expression Assay Hs00166123_ m1 (FAM)
- ABCC3 (MRP-3) geni: TaqMan Gene Expression Assay Hs00978473_ m1 (FAM)
- ABCC6 (MRP-6) geni: TaqMan Gene Expression Assay Hs00184566_ m1 (FAM)
- ABCC10 (MRP-7) geni: TaqMan Gene Expression Assay Hs01056200_ m1 (FAM)
- GSTP1 geni: TaqMan Gene Expression Assay Hs02512067_s1 (FAM)
- β -Actin geni: Endojen Kontrol (VIC-MGB)

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), çift zincirli kalıp DNA'ya bağlanan primerler sayesinde belirlenen hedef bölgenin (gen), Taq polimeraz (*Thermus aquaticus*) enzimiyle geometrik olarak çoğaltılması işlemidir. Çoğaltma işlemi çift zincirli DNA'nın denatürasyonu, primerlerin DNA zincirine bağlanması ve primer uzaması basamaklarından oluşmaktadır. PCR reaksiyonlarının gerçekleşmesi esnasında niceliksel analiz için sinyal kaynağı olarak primerlere bağlı ya da primerlerden bağımsız floresan işaretleyiciler kullanılır. Bu çalışmada TaqMan primer problar kullanılmıştır.

PCR Mix Hazırlanışı: Thermo Fisher Scientific TaqMan® Gene Expression Master Mix protokolüne göre işlem basamakları gerçekleştirilmiştir. 6 μ l steril su, 10 μ l

master mix, 1 µl β-aktin, 1 µl belirlenen gen probu bir ependorfta karıştırılmıştır. Protokole uygun olarak işlemlerin hepsi buz üzerinde yapılarak problemlerin ve master mix'in ışık almamasına özen gösterilmiştir.

Realtime Multipleks PCR: Multipleks PCR yönteminin geleneksel monopleks PCR'a göre üstünlüğü, birden fazla genin tek bir kuyucukta yani tek cDNA üzerinde çalışılabilmesi böylelikle bir çalışmada birden fazla genin ifadesinin ortaya konulabilmesidir. Gen ekspresyon analizi işlemine başlamadan önce Realtime PCR için kontrol ve optimizasyon işlemleri yapılmıştır. Her bir hücre hattından sentezlenen cDNA örnekleri için 3'er tekrarlı olarak şekilde Şekil 3.6.'daki gibi plak tasarlanmıştır. Örneğin MDR-1 geni için KMS28 24 saat kontrol grubu, plağın A bölümünde 1, 2, 3 numaralı sütunlarda ve KMS20 24 saat 30 nM grubu, D bölümünde 4, 5, 6 numaralı sütunlarda çalışılmıştır.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	MDR1 KMS28			MDR1 KMS20			MRP1 KMS28			MRP1 KMS20		
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Şekil 3.6. Gen ifade analizi için kullanılacak 96'lık PCR plağının tasarımı.

Plaktaki her bir kuyuya 18 µl PCR mix dağıtılmış ve 2 µl belirlenen cDNA'lar eklenmiştir. Endojen kontrol olarak β-aktin kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak cDNA içermeyen reaksiyon karışımı kullanılmıştır. 96'lık plak üzeri hava kabarcığı kalmayacak şekilde kaplanmış ardından 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. ABI 7500 Fast Realtime PCR cihazında amplifikasyon basamakları; 50°C-20 sn, 95°C-10 dk, 95°C-15 sn, 60°C-1 dk toplamda 40 döngü olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu şekilde yapılan PCR işeminin ardından cihaz verileri Microsoft Excele aktarılmış ve istatistiksel hesaplamalar için kullanılmıştır.

3.5.2 Realtime PCR Ürünlerindeki Katlık Değişimin Hesaplanması

PCR ürünlerindeki floresan ışımlar Ct (Cycle threshold) olarak gösterilir. Her bir gen için belirlenen Ct değerlerinin hücrede her zaman ifade olan referans bir gene (β -aktin) göre karşılaştırılması gereklidir. Bu sayede çalışılan genin hücrede her zaman ifade olan gene göre ne kadar farklı ifade edildiği belirlenir (ΔCt). Daha sonra bortezomib uygulanan grupların ΔCt değerleri kontrol grubu ΔCt değerlerinden çıkarılarak, çalışılan genin bortezomib uygulanan grupta kontrol grubundan ne kadar farklı ifade edildiği belirlenir ($\Delta\Delta Ct$). Bu sayede gruplar arasındaki katlık değişim, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (3.3a) veya (3.3b) formüllerinden biriyle hesaplanmış olur.

$$RQ \text{ (Rölatif Kantitasyon)} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta Ct_{\text{Çalışma grubu}} = Ct_{(\text{Hedef gen})} - Ct_{(\text{Referans gen})} \quad (3.3a)$$

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

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

$$\Delta\Delta Ct = \frac{\text{Çalışma grubu } [Ct_{(\text{Hedef gen})} - Ct_{(\text{Referans gen})}] - \text{Kontrol grubu } [Ct_{(\text{Hedef gen})} - Ct_{(\text{Referans gen})}]}{Ct_{(\text{Hedef gen})} - Ct_{(\text{Referans gen})}} \quad (3.3b)$$

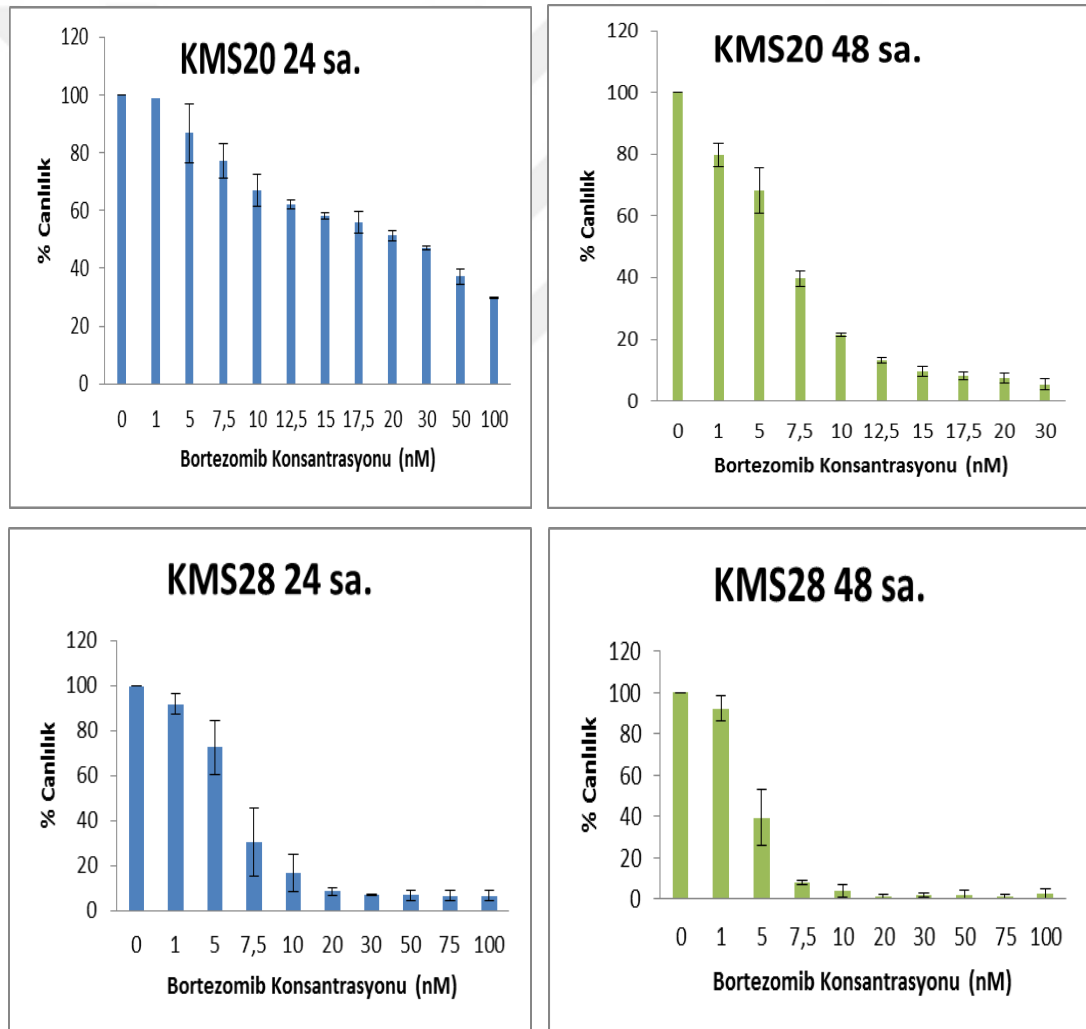
3.5.3 İstatistiksel Analiz

Hücre hatlarında bortezomib dozunun arttırılmasına bağlı olarak 24 ile 48 saat sürelerdeki MDR ilişkili genlerin ifadesindeki değişim ve sabit bortezomib dozlarındaki 24 ile 48 saat sürelerdeki MDR ilişkili genlerin ifadesindeki değişim için ayrı ayrı istatistiksel analiz yapılmıştır. Microsoft Excel programında hesaplanan ΔCt değerleri GraphPad prism 7 yazılımına aktarılarak ANOVA testi ile $\Delta\Delta Ct$ farklılığı, p değeri ($<0,05$) olacak şekilde belirlenmiştir. Hangi gruplar arasında farklılığın olduğu p değeri ($<0,05$) olacak şekilde Dunnet testi ile değerlendirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 MTT Analizi Sonuçları

Tez kapsamında kullanılan multiple myeloma KMS20 (bortezomibe dirençli) ve KMS28 (bortezomibe hassas) hücre hatları kullanılmıştır. KMS20 hücre hattının bortezomibe dirençli ve KMS28 hücre hattının bortezomibe hassas olduğu hem bu çalışmada hem de diğer çalışmalarda gösterilmiştir (Oh vd., 2012; Lee vd., 2012; Song vd., 2013a,b, 2015; Nara vd., 2013). Yapılan MTT analizi işlemlerine göre KMS20 ve KMS28 hücre hatlarında uygulanan bortezomib dozuna karşılık oluşan % hücre hayatta kalma eğrileri Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.



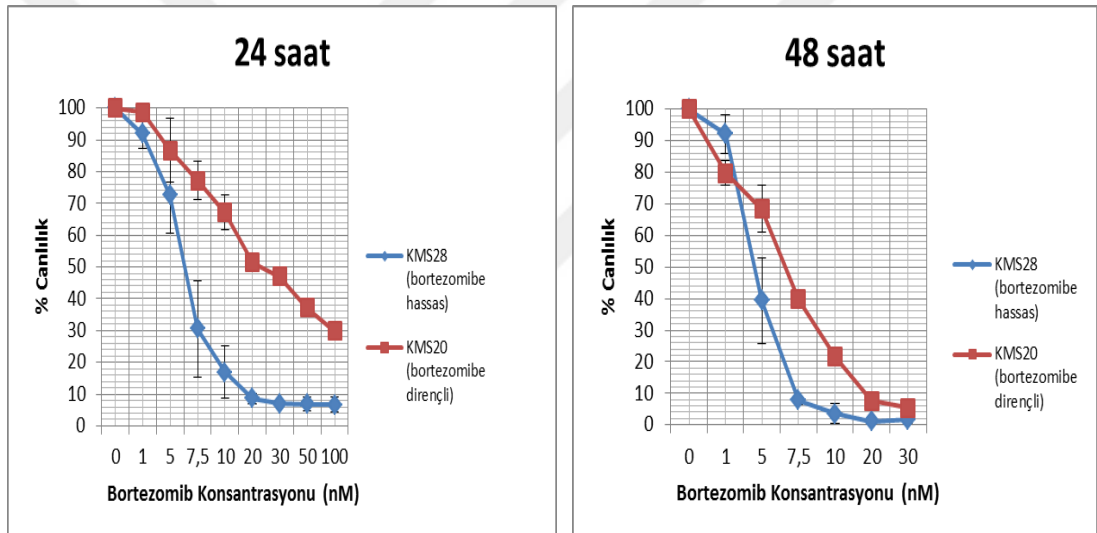
Şekil 4.1. Bortezomib dozunun artışına bağlı olarak hücre hatlarının hayatta kalma grafikleri.

4.1.1. IC₅₀ Değerleri

KMS20 ve KMS28 hücre hatlarının 24 ve 48 saat sürelerdeki bortezomibe karşı gösterdikleri IC₅₀ değerleri Çizelge 4.1. ve Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Hücre hatlarının 24 ve 48 saat sürelerdeki IC₅₀ değerleri.

Hücre Hattı	Süre	IC 50	Std Ht
KMS20(bortezomibe dirençli)	24 saat	25,64nM	±1,08
KMS28(bortezomibe hassas)	24 saat	6,295nM	±1,06
KMS20(bortezomibe dirençli)	48 saat	6,389nM	±1,09
KMS28(bortezomibe hassas)	48 saat	4,548nM	±1,04



Şekil 4.2. Hücre hatlarının 24 ve 48 saatlerdeki IC₅₀ değeri grafikleri.

4.1.2. Dirençlilik İndislerinin Hesaplanması

Multiple myeloma KMS20 ve KMS28 hücre hatlarının dirençlilik indisleri (4.1)'deki formüle göre belirlenmiştir.

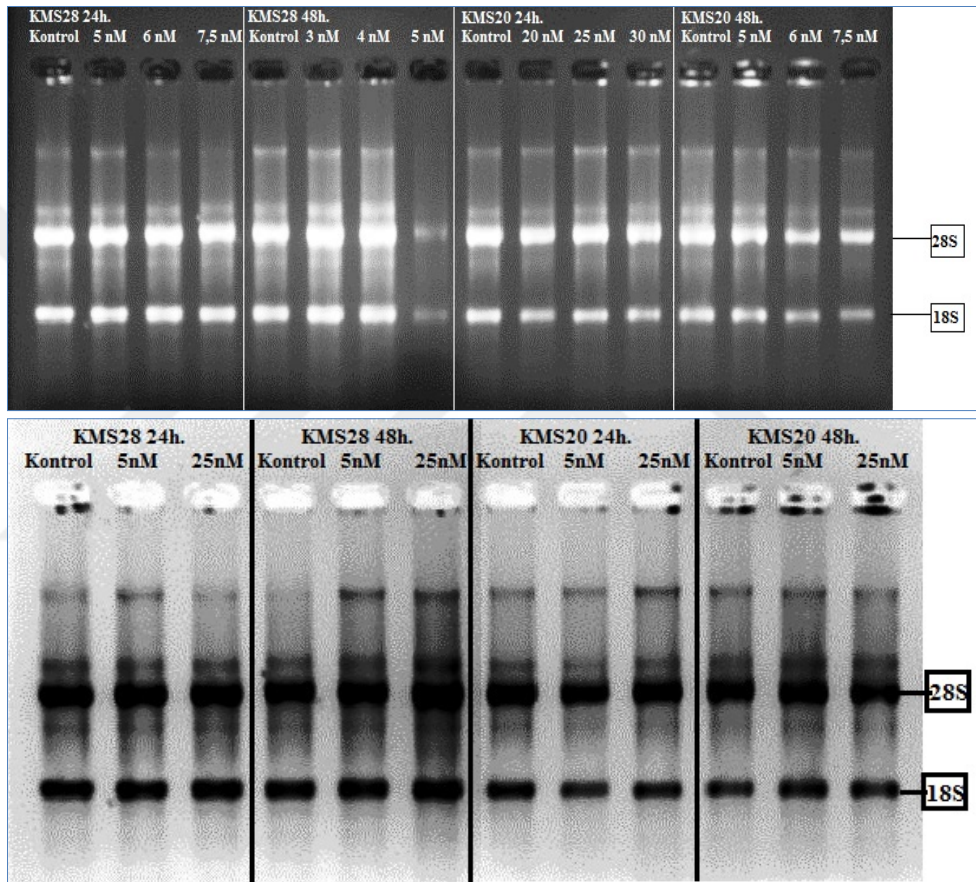
$$R \text{ indis} = \frac{IC_{50} \text{ Dirençli Hat}}{IC_{50} \text{ Hassas Hat}} \quad (4.1)$$

24 saat bortezomib uygulaması sonucunda $\frac{25,64}{6,30} = 4,06$, 48 saat bortezomib uygulaması sonucunda $\frac{6,39}{4,55} = 1,40$ olarak bulunmuştur. Buna göre multiple

myeloma KMS20 hücre hattının multiple myeloma KMS28 hücre hattına göre, 24 saatte bortezomibe karşı 4 katlık; 48 saatte 1,4 katlık bir direnç gösterdikleri belirlenmiştir.

4.2 RNA İzolasyonu Sonuçları

Hücre hatlarından izole edilen RNA'ların %1'lik agaroz jel elektroforezi ile elde edilen görüntüsü Şekil 4.3.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Hücre hatlarından izole edilen RNA'ların agaroz jel görüntüleri.

Hücre hatlarından izole edilen RNA'ların konsantrasyonları nanodrop cihazıyla yapılan ölçümlerine göre Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Hücre hatlarından izole edilen RNA'ların konsantrasyonları.

ÖRNEK	NUKLEİK ASİT MİKTARI	ÖRNEK	NUKLEİK ASİT MİKTARI
KMS28 24 S. KONT.	0,4705 µg/µl	KMS28 24 S. KONT.	0,3129 µg/µl
KMS28 24 S. 5 nM	0,3543 µg/µl	KMS28 24 S. 5 nM	0,2681 µg/µl
KMS28 24 S. 6 nM	0,3768 µg/µl	KMS28 24 S. 25 nM	0,2549 µg/µl
KMS28 24 S. 7,5 nM	0,3270 µg/µl	KMS28 48 S. KONT.	0,4083 µg/µl
KMS28 48 S. KONT.	0,4063 µg/µl	KMS28 48 S. 5 nM	0,4352 µg/µl
KMS28 48 S. 3 nM	0,4535 µg/µl	KMS28 48 S. 25 nM	0,1631 µg/µl
KMS28 48 S. 4 nM	0,4276 µg/µl	KMS20 24 S. KONT.	0,4315 µg/µl
KMS28 48 S. 5 nM	0,4067 µg/µl	KMS20 24 S. 5 nM	0,3016 µg/µl
KMS20 24 S. KONT.	0,3437 µg/µl	KMS20 24 S. 25 nM	0,2629 µg/µl
KMS20 24 S. 20 nM	0,2366 µg/µl	KMS20 48 S. KONT.	0,4025 µg/µl
KMS20 24 S. 25 nM	0,2515 µg/µl	KMS20 48 S. 5 nM	0,3605 µg/µl
KMS20 24 S. 30 nM	0,2412 µg/µl	KMS20 48 S. 25 nM	0,3396 µg/µl
KMS20 48 S. KONT.	0,3347 µg/µl		
KMS20 48 S. 5 nM	0,3090 µg/µl		
KMS20 48 S. 6 nM	0,2432 µg/µl		
KMS20 48 S. 7,5 nM	0,2686 µg/µl		

4.3 cDNA Sentezi Sonuçları

Hücre hatlarından sentezlenen cDNA'ların konsantrasyonları nanodrop cihazıyla yapılan ölçümlerine göre Çizelge 4.3.'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Hücre hatlarından izole edilen cDNA'ların konsantrasyonları.

ÖRNEK	NUKLEİK ASİT MİKTARI	ÖRNEK	NUKLEİK ASİT MİKTARI
KMS28 24 S. KONT.	2253,1 ng/µl	KMS28 24 S. KONT.	2375,6 ng/µl
KMS28 24 S. 5 nM	2209,2 ng/µl	KMS28 24 S. 5 nM	2178,0 ng/µl
KMS28 24 S. 6 nM	2031,8 ng/µl	KMS28 24 S. 25 nM	2165,4 ng/µl
KMS28 24 S. 7,5 nM	2182,8 ng/µl	KMS28 48 S. KONT.	1863,1 ng/µl
KMS28 48 S. KONT.	2048,0 ng/µl	KMS28 48 S. 5 nM	2274,0 ng/µl
KMS28 48 S. 3 nM	2203,1 ng/µl	KMS28 48 S. 25 nM	2237,4 ng/µl
KMS28 48 S. 4 nM	2186,7 ng/µl	KMS20 24 S. KONT.	2354,6 ng/µl
KMS28 48 S. 5 nM	2202,7 ng/µl	KMS20 24 S. 5 nM	2345,8 ng/µl
KMS20 24 S. KONT.	2198,9 ng/µl	KMS20 24 S. 25 nM	2294,2 ng/µl
KMS20 24 S. 20 nM	2190,9 ng/µl	KMS20 48 S. KONT.	2370,1 ng/µl
KMS20 24 S. 25 nM	2212,4 ng/µl	KMS20 48 S. 5 nM	2292,0 ng/µl
KMS20 24 S. 30 nM	2247,4 ng/µl	KMS20 48 S. 25 nM	2392,7 ng/µl
KMS20 48 S. KONT.	2210,4 ng/µl		
KMS20 48 S. 5 nM	2203,0 ng/µl		
KMS20 48 S. 6 nM	2206,8 ng/µl		
KMS20 48 S. 7,5 nM	2198,9 ng/µl		

4.4 Gen İfade Analizi

KMS20 ve KMS28 hücre hatlarında bortezomib dozunun arttırılmasına bağlı olarak 24 ve 48 saat sürelerdeki MDR ile ilgili genlerin qRT-PCR (kantitatif gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) ifade düzeyleri her bir gen için ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Sabit bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MDR ile ilgili genlerin qRT-PCR ifade düzeyleri ise her bir gen için birlikte değerlendirilmiştir. Bütün sonuçlar $\Delta\Delta C_t$ ve RQ (Rölatif Kantitasyon) olarak çizelge ve grafik şeklinde gösterilmiştir.

4.4.1 Hücre Hatlarının 24 Saat İçerisinde Bortezomib Doz Artışına Bağlı Olarak Gen İfade Analizleri

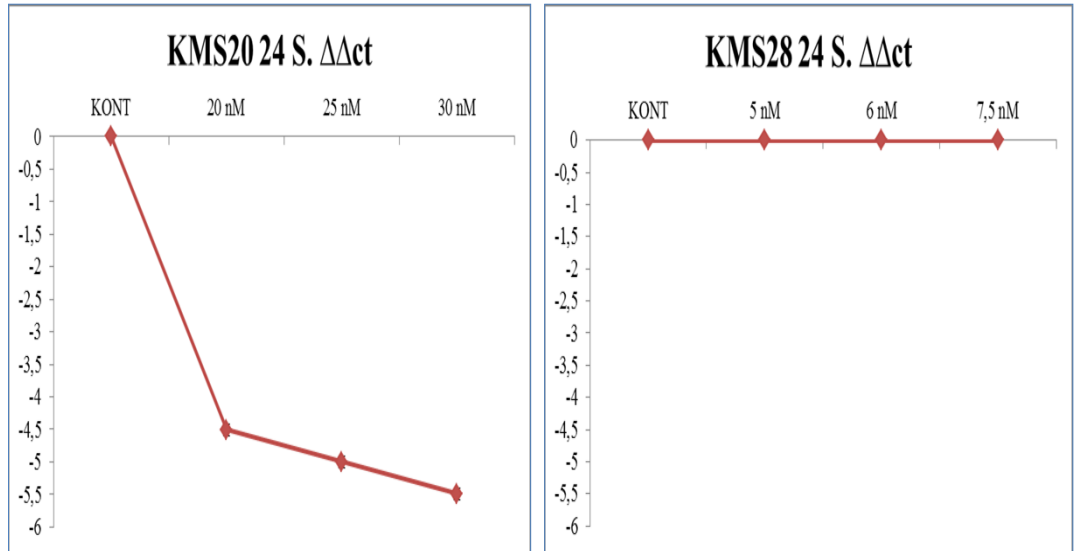
4.4.1.1 P-gp Geninin İfade Sonuçları

KMS20 (bortezomibe dirençli) hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre gruplar normal dağılıma sahiptir ve varyansları birbirinden farklıdır ($p<0,0001$; $r^2=0,9982$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.4.'de görüldüğü gibi bortezomib miktarının arttırılmasıyla P-gp geni ifadesinin arttığını göstermektedir.

KMS28 (bortezomibe hassas) hücre hattında bortezomib dozunun artışına bağlı olarak 24 saat içerisinde P-gp geni ifadesi tespit edilmemiştir.

Çizelge 4.4. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak P-gp geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.

KMS20 24 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht	KMS28 24 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht
KONT	0	0	0	KONT	0	0	0
20 nM	-4,51	0,0001	0,09	5 nM	0,00	0,0000	0,00
25 nM	-5,00	0,0001	0,09	6 nM	0,00	0,0000	0,00
30 nM	-5,49	0,0001	0,09	7,5 nM	0,00	0,0000	0,00



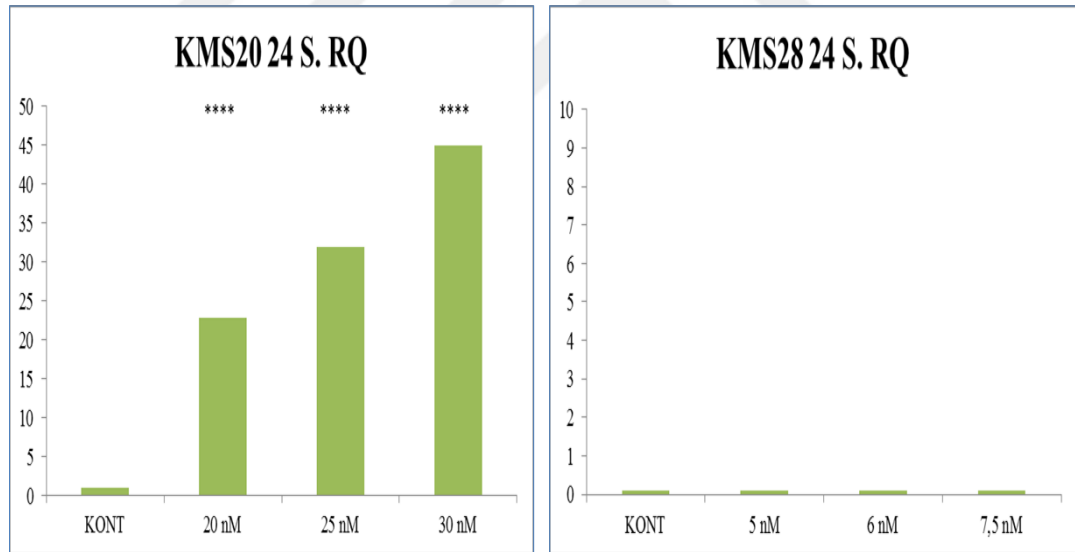
Şekil 4.4. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak P-gp geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.

Çizelge ve Şekil 4.5.'de görüldüğü gibi P-gp geni ifadesi KMS20 hücre hattı 24 saat içerisinde 20 nM bortezomibe maruz kaldığında 22,75 kat, 25 nM bortezomibe maruz kaldığında 31,96 kat, 30 nM bortezomibe maruz kaldığında ise 44,98 kat fazla olmaktadır.

Çizelge ve Şekil 4.5.'de görüldüğü gibi KMS28 hücre hattında bortezomib dozunun artışına bağlı olarak 24 saat içerisinde P-gp geni ifadesi tespit edilmemiştir.

Çizelge 4.5. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak P-gp geni RQ sonuçları.

KMS20 24 S.	RQ	KMS28 24 S.	RQ
KONT	1	KONT	0
20 nM	22,75	5 nM	0,00
25 nM	31,96	6 nM	0,00
30 nM	44,98	7,5 nM	0,00



Şekil 4.5. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak P-gp geni RQ sonuçları grafiği.

4.4.1.2 MRP-1 Geninin İfade Sonuçları

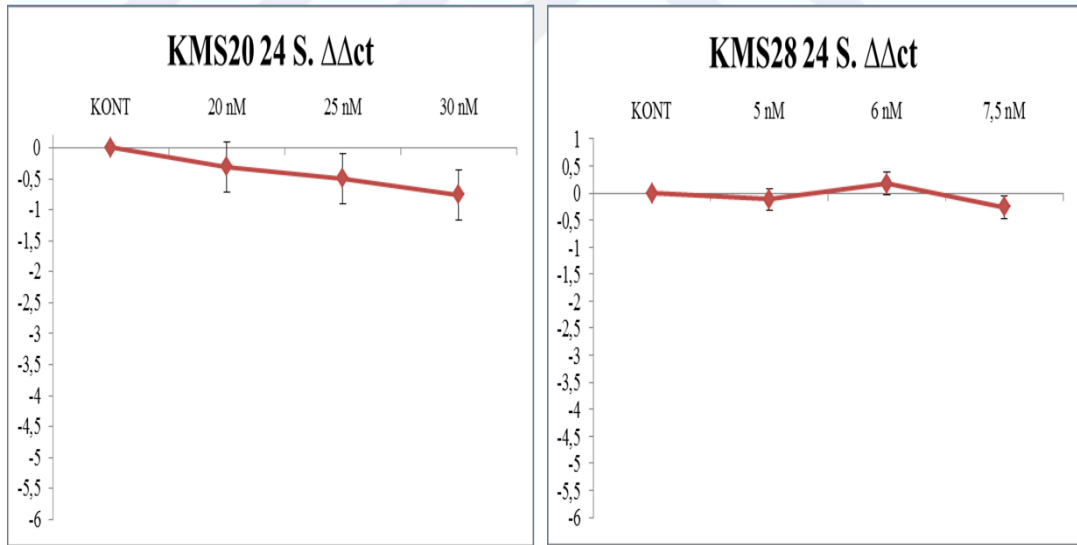
KMS20 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre gruplar normal dağılıma sahiptir fakat varyansları birbirinden farklı değildir ($p=0,3480$; $r^2=0,3228$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.6.'da görüldüğü gibi

bortezomib miktarının artırılmasıyla MRP-1 geni ifadesinin değişmediğini göstermektedir.

KMS28 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre gruplar normal dağılıma sahiptir fakat varyansları birbirinden farklı değildir ($p=0,2633$; $r^2=0,3756$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.6.'da görüldüğü gibi bortezomib miktarının artırılmasıyla MRP-1 geni ifadesinin değişmediğini göstermektedir.

Çizelge 4.6. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-1 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.

KMS20 24 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht	KMS28 24 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht
KONT	0	0	0	KONT	0	0	0
20 nM	-0,31	0,7905	0,40	5 nM	-0,12	0,8926	0,21
25 nM	-0,49	0,5052	0,40	6 nM	0,17	0,7476	0,21
30 nM	-0,76	0,2123	0,40	7,5 nM	-0,26	0,4741	0,21



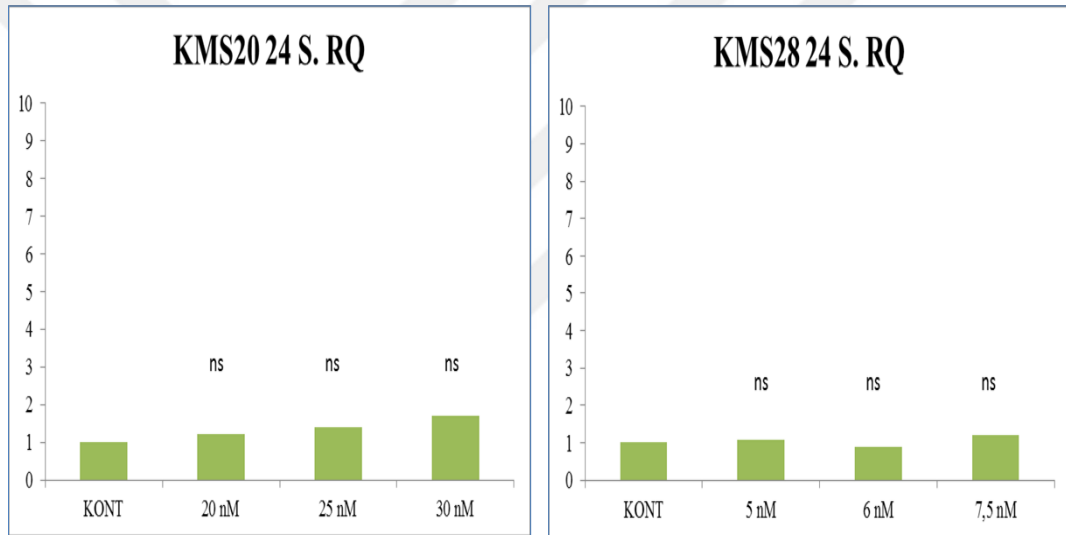
Şekil 4.6. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-1 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.

Çizelge ve Şekil 4.7.'de görüldüğü gibi KMS20 hücre hattında bortezomib dozunun artışına bağlı olarak 24 saat içerisinde MRP-1 geni ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmamıştır.

Çizelge ve Şekil 4.7.'de görüldüğü gibi KMS28 hücre hattında da aynı şekilde bortezomib dozunun artışına bağlı olarak 24 saat içerisinde MRP-1 geni ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmamıştır.

Çizelge 4.7. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-1 geni RQ sonuçları.

KMS20 24 S. RQ		KMS28 24 S. RQ	
KONT	1	KONT	1
20 nM	1,24	5 nM	1,08
25 nM	1,41	6 nM	0,89
30 nM	1,70	7,5 nM	1,20



Şekil 4.7. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-1 geni RQ sonuçları grafiği.

4.4.1.3 MRP-2 Geninin İfade Sonuçları

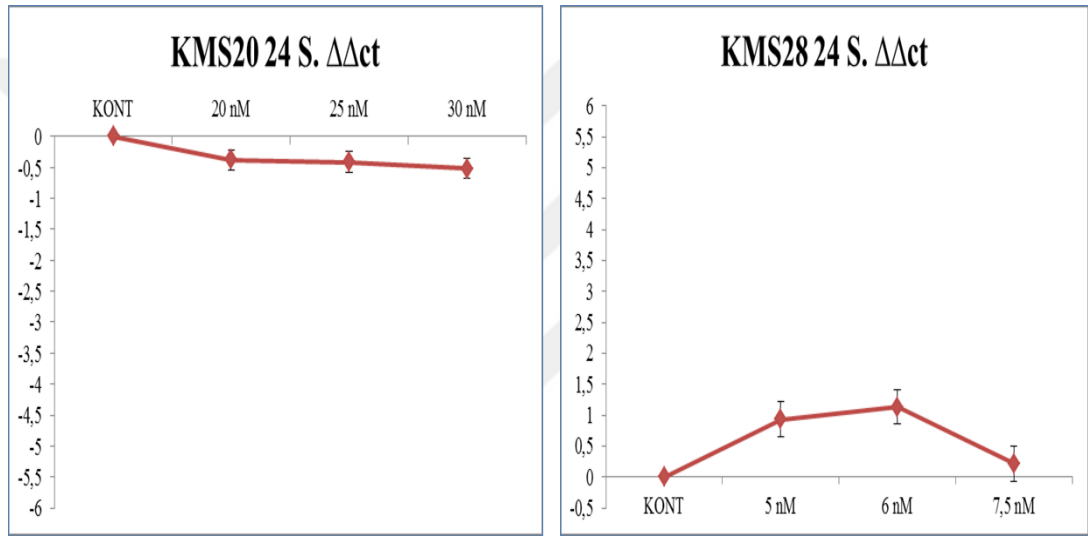
KMS20 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre gruplar normal dağılıma sahiptir fakat varyansları birbirinden farklı değildir ($p=0,0608$; $r^2=0,5827$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.8.'de görüldüğü gibi bortezomib miktarının arttırılmasıyla MRP-2 geni ifadesinin değişmediğini göstermektedir.

KMS28 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre gruplar normal dağılıma sahiptir ve varyansları birbirinden farklıdır ($p=0,0096$; $r^2=0,7427$).

Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.8.'de görüldüğü gibi bortezomib miktarının arttırılmasıyla MRP-2 geni ifadesinin azaldığını göstermektedir.

Çizelge 4.8. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-2 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.

KMS20 24 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht	KMS28 24 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht
KONT	0	0	0	KONT	0	0	0
20 nM	-0,38	0,1208	0,17	5 nM	0,93	0,0251	0,28
25 nM	-0,42	0,0880	0,17	6 nM	1,13	0,0093	0,28
30 nM	-0,52	0,0350	0,17	7,5 nM	0,22	0,7811	0,28



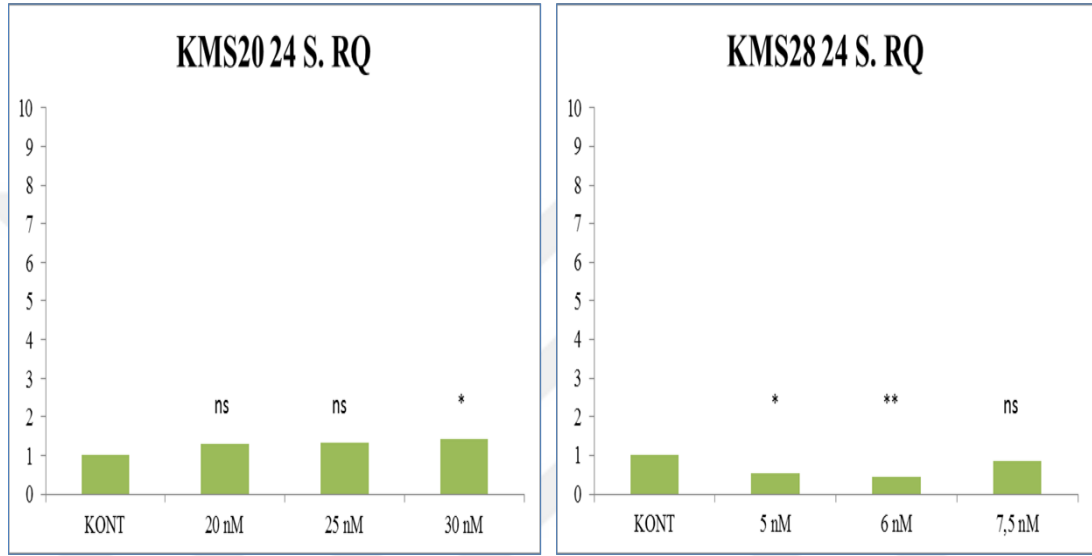
Şekil 4.8. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-2 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.

Çizelge ve Şekil 4.9.'da görüldüğü gibi KMS20 hücre hattında bortezomib dozunun artışına bağlı olarak 24 saat içerisinde MRP-2 geni ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmamıştır.

Çizelge ve Şekil 4.9.'da görüldüğü gibi MRP-2 geni ifadesi KMS28 hücre hattı 24 saat içerisinde 5 nM bortezomibe maruz kaldığında 0,52 kat, 6 nM bortezomibe maruz kaldığında 0,46 kat az olmaktadır.

Çizelge 4.9. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-2 geni RQ sonuçları.

KMS20 24 S. RQ	KMS28 24 S. RQ
KONT	KONT
20 nM	5 nM
25 nM	6 nM
30 nM	7,5 nM



Şekil 4.9. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-2 geni RQ sonuçları grafiği.

4.4.1.4 MRP-3 Geninin İfade Sonuçları

KMS20 hücre hattında bortezomib dozunun artışına bağlı olarak 24 saat içerisinde MRP-3 geni ifadesi tespit edilmemiştir.

KMS28 hücre hattında bortezomib dozunun artışına bağlı olarak 24 saat içerisinde MRP-3 geni ifadesi tespit edilmemiştir.

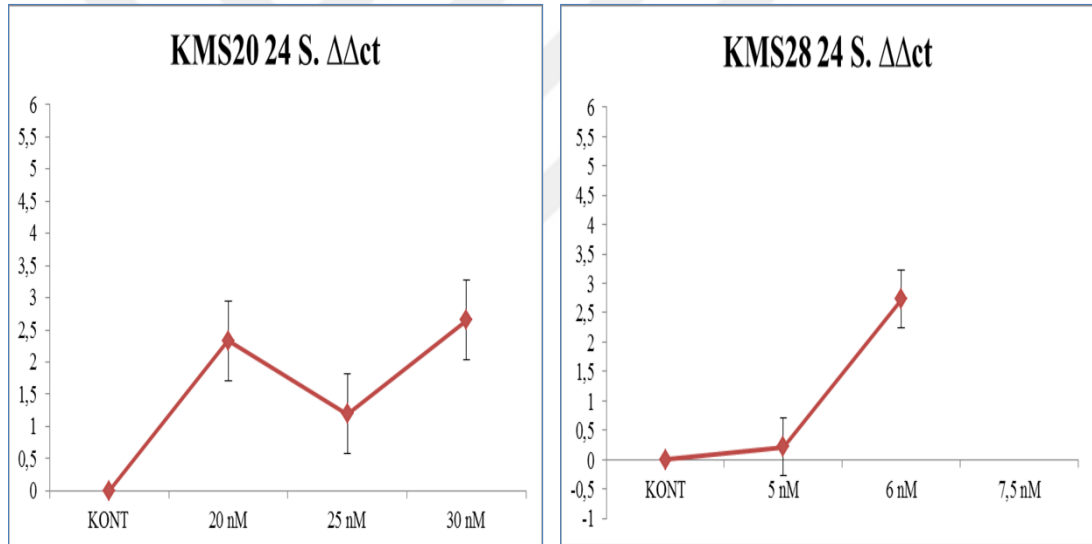
4.4.1.5 MRP-6 Geninin İfade Sonuçları

KMS20 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre gruplar normal dağılıma sahiptir ve varyansları birbirinden farklıdır ($p=0,0104$; $r^2=0,7372$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.10.'da görüldüğü gibi bortezomib miktarının arttırılmasıyla MRP-6 geni ifadesinin azaldığını göstermektedir.

KMS28 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre gruplar normal dağılıma sahiptir ve varyansları birbirinden farklıdır ($p=0,0024$; $r^2=0,866$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.10.'da görüldüğü gibi bortezomib miktarının arttırılmasıyla MRP-6 geni ifadesinin azaldığını, 7,5 nM'da ise MRP-6 geni ifadesinin tespit edilmediğini göstermektedir.

Çizelge 4.10. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-6 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.

KMS20 24 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht	KMS28 24 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht
KONT	0	0	0	KONT	0	0	0
20 nM	2,33	0,0144	0,62	5 nM	0,22	0,8705	0,49
25 nM	1,20	0,2057	0,62	6 nM	2,73	0,0025	0,49
30 nM	2,65	0,0071	0,62	7,5 nM			



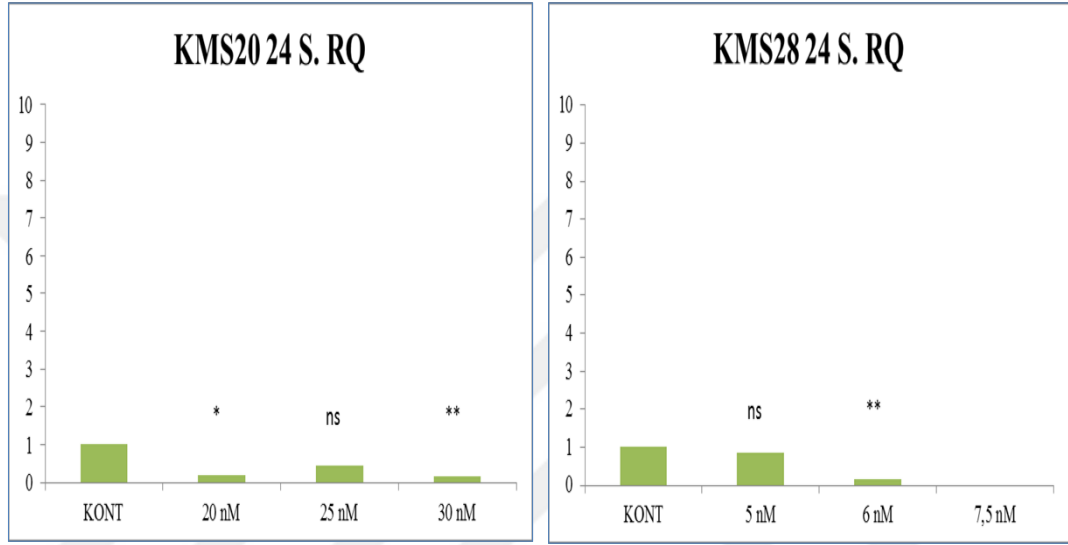
Şekil 4.10. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-6 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.

Çizelge ve Şekil 4.11.'de görüldüğü gibi MRP-6 geni ifadesi KMS20 hücre hattı 24 saat içerisinde 20 nM bortezomibe maruz kaldığında 0,20 kat, 30 nM bortezomibe maruz kaldığında ise 0,16 kat az olmaktadır.

Çizelge ve Şekil 4.11.'de görüldüğü gibi MRP-6 geni ifadesi KMS28 hücre hattı 24 saat içerisinde 6 nM bortezomibe maruz kaldığında 0,15 kat az olmaktadır.

Çizelge 4.11. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-6 geni RQ sonuçları.

KMS20 24 S.	RQ	KMS28 24 S.	RQ
KONT	1	KONT	1
20 nM	0,20	5 nM	0,86
25 nM	0,44	6 nM	0,15
30 nM	0,16	7,5 nM	



Şekil 4.11. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-6 geni RQ sonuçları grafiği.

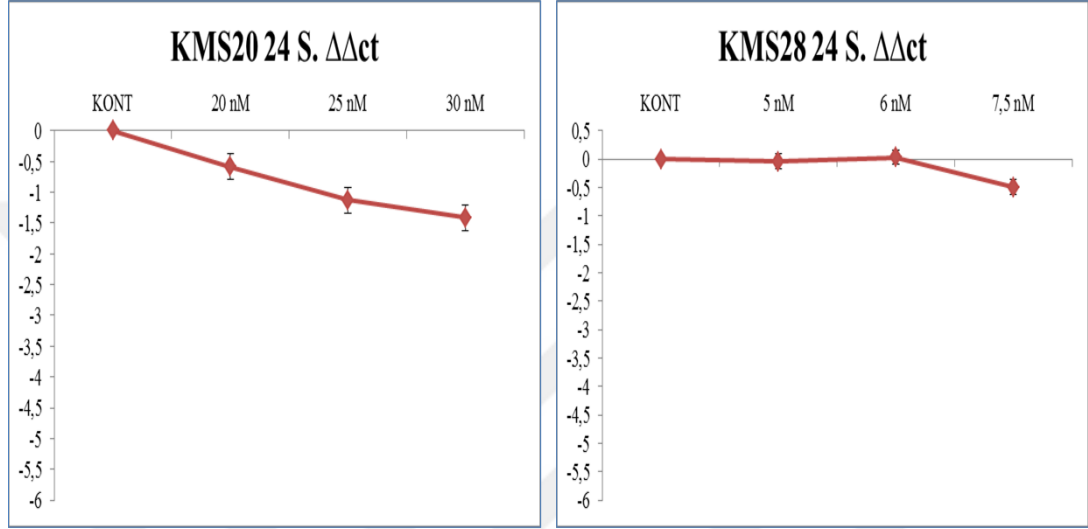
4.4.1.6 MRP-7 Geninin İfade Sonuçları

KMS20 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre gruplar normal dağılıma sahiptir ve varyansları birbirinden farklıdır ($p=0,0007$; $r^2=0,8703$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.12.'de görüldüğü gibi bortezomib miktarının arttırılmasıyla MRP-7 geni ifadesinin arttığını göstermektedir.

KMS28 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre gruplar normal dağılıma sahiptir ve varyansları birbirinden farklıdır ($p=0,0121$; $r^2=0,7266$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.12.'de görüldüğü gibi bortezomib dozunun IC_{50} değeri üzerindeki 7,5nM'da MRP-7 geni ifadesinin arttığını göstermektedir.

Çizelge 4.12. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-7 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.

KMS20 24 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht	KMS28 24 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht
KONT	0	0	0	KONT	0	0	0
20 nM	-0,59	0,0534	0,21	5 nM	-0,04	0,9747	0,13
25 nM	-1,13	0,0017	0,21	6 nM	0,03	0,9887	0,13
30 nM	-1,41	0,0004	0,21	7,5 nM	-0,49	0,0140	0,13



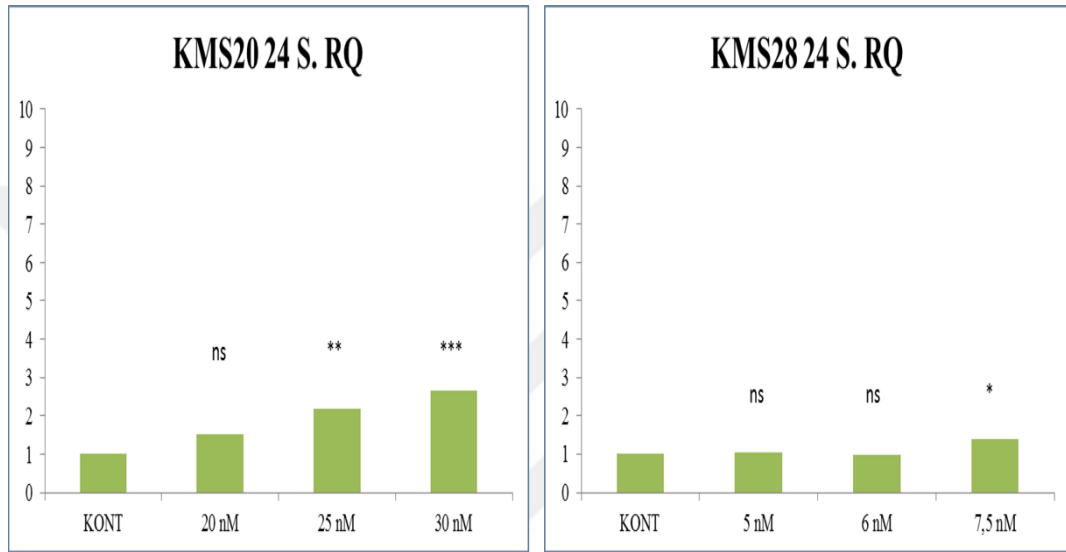
Şekil 4.12. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-7 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.

Çizelge ve Şekil 4.13.'de görüldüğü gibi MRP-7 geni ifadesi KMS20 hücre hattı 24 saat içerisinde 25 nM bortezomibe maruz kaldığında 2,18 kat, 30 nM bortezomibe maruz kaldığında ise 2,66 kat fazla olmaktadır.

Çizelge ve Şekil 4.13.'de görüldüğü gibi MRP-7 geni ifadesi KMS28 hücre hattı 24 saat içerisinde IC_{50} değeri üzerindeki 7,5 nM bortezomibe maruz kaldığında 1,40 kat fazla olmaktadır, diğer dozlarda ise MRP-7 geni ifadesi artışı gözlenmemiştir.

Çizelge 4.13. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-7 geni RQ sonuçları.

KMS20 24 S. RQ	KMS28 24 S. RQ
KONT	KONT
20 nM	5 nM
25 nM	6 nM
30 nM	7,5 nM



Şekil 4.13. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-7 geni RQ sonuçları grafiği.

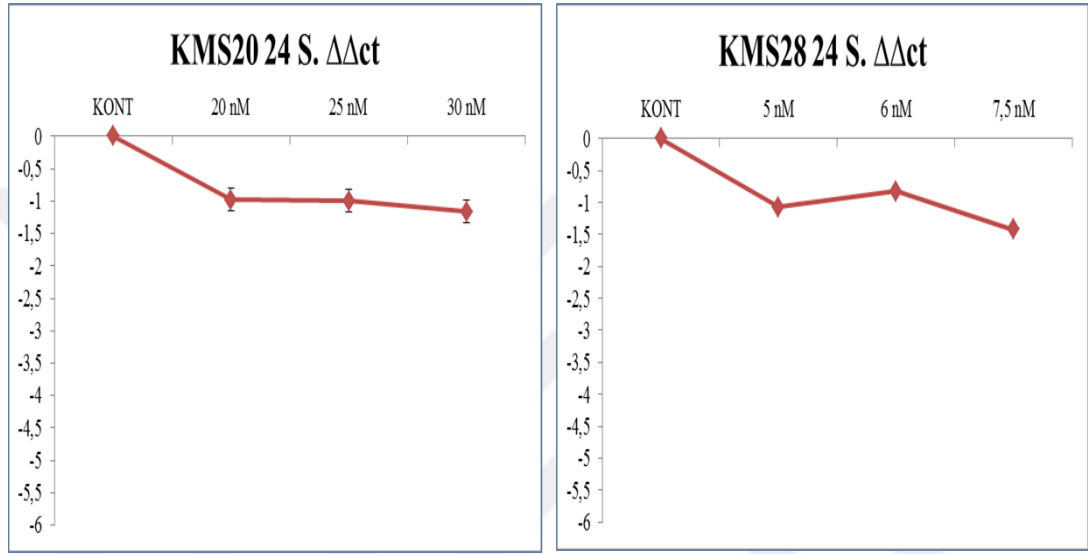
4.4.1.7 GSTP1 Geninin İfade Sonuçları

KMS20 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre gruplar normal dağılıma sahiptir ve varyansları birbirinden farklıdır ($p=0,0006$; $r^2=0,8725$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.14.'de görüldüğü gibi bortezomib miktarının arttırılmasıyla GSTP1 geni ifadesinin arttığını göstermektedir.

KMS28 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre gruplar normal dağılıma sahiptir ve varyansları birbirinden farklıdır ($p<0,0001$; $r^2=0,9927$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.14.'de görüldüğü gibi bortezomib miktarının arttırılmasıyla GSTP1 geni ifadesinin arttığını göstermektedir.

Çizelge 4.14. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak GSTP1 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.

KMS20 24 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht	KMS28 24 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht
KONT	0	0	0	KONT	0	0	0
20 nM	-0,98	0,0014	0,18	5 nM	-1,07	0,0001	0,04
25 nM	-1,00	0,0012	0,18	6 nM	-0,83	0,0001	0,04
30 nM	-1,17	0,0004	0,18	7,5 nM	-1,42	0,0001	0,04



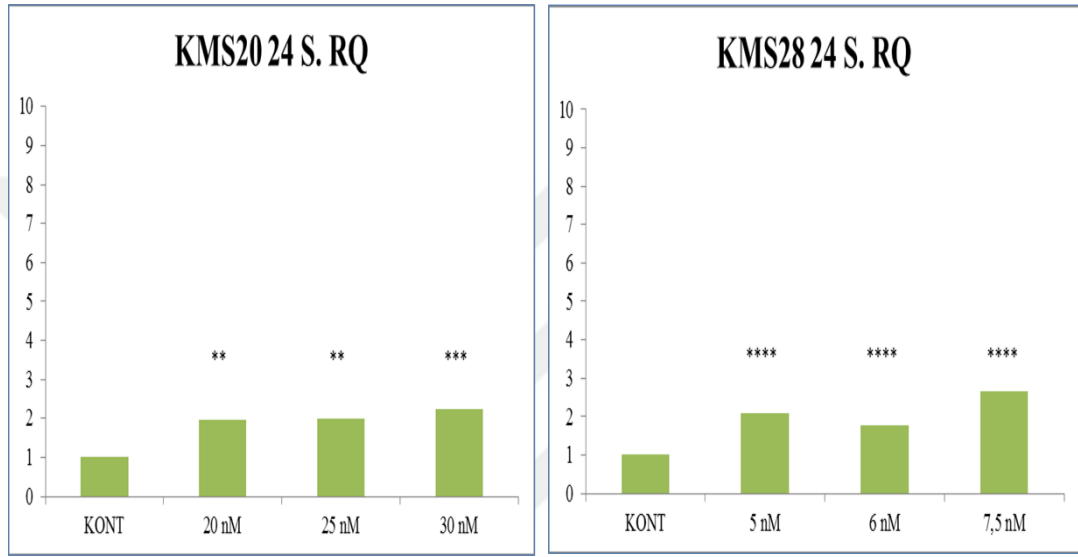
Şekil 4.14. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak GSTP1 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.

Çizelge ve Şekil 4.15.'de görüldüğü gibi GSTP1 geni ifadesi KMS20 hücre hattı 24 saat içerisinde 20 nM bortezomibe maruz kaldığında 1,97 kat, 25 nM bortezomibe maruz kaldığında 2 kat, 30 nM bortezomibe maruz kaldığında ise 2,24 kat fazla olmaktadır.

Çizelge ve Şekil 4.15.'de görüldüğü gibi GSTP1 geni ifadesi KMS28 hücre hattı 24 saat içerisinde 5 nM bortezomibe maruz kaldığında 2,09 kat, 6 nM bortezomibe maruz kaldığında 1,77 kat, 7,5 nM bortezomibe maruz kaldığında ise 2,67 kat fazla olmaktadır.

Çizelge 4.15. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak GSTP1 geni RQ sonuçları.

KMS20 24 S.	RQ	KMS28 24 S.	RQ
KONT	1	KONT	1
20 nM	1,97	5 nM	2,09
25 nM	2,00	6 nM	1,77
30 nM	2,24	7,5 nM	2,67



Şekil 4.15. Hücre hatlarının 24 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak GSTP1 geni RQ sonuçları grafiği.

4.4.2 Hücre Hatlarının 48 Saat İçerisinde Bortezomib Doz Artışına Bağlı Olarak Gen İfade Analizleri

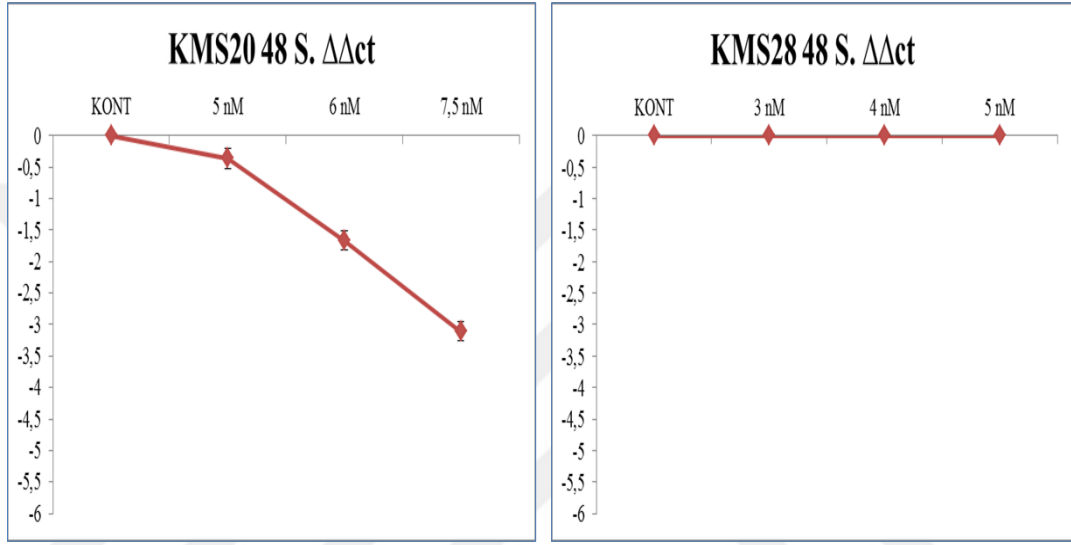
4.4.2.1 P-gp Geninin İfade Sonuçları

KMS20 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre gruplar normal dağılıma sahiptir ve varyansları birbirinden farklıdır ($p < 0,0001$; $r^2 = 0,9844$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.16.'da görüldüğü gibi bortezomib miktarının arttırılmasıyla P-gp geni ifadesinin arttığını göstermektedir.

KMS28 hücre hattında bortezomib dozunun artışına bağlı olarak 48 saat içerisinde P-gp geni ifadesi tespit edilmemiştir.

Çizelge 4.16. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak P-gp geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.

KMS20 48 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht	KMS28 48 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht
KONT	0	0	0	KONT	0	0	0
5 nM	-0,36	0,1093	0,15	3 nM	0,00	0,0000	0,00
6 nM	-1,67	0,0001	0,15	4 nM	0,00	0,0000	0,00
7,5 nM	-3,11	0,0001	0,15	5 nM	0,00	0,0000	0,00



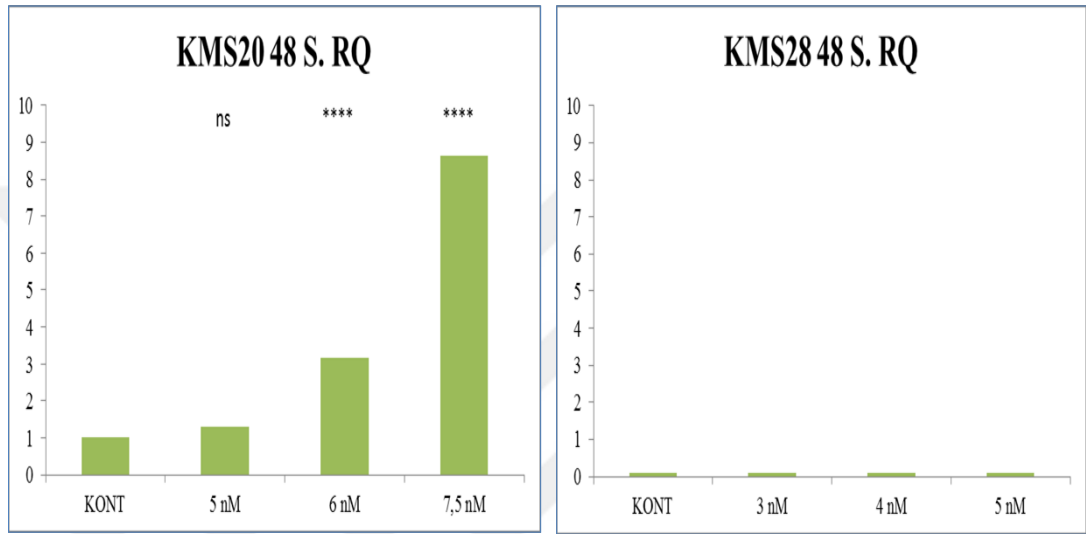
Şekil 4.16. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak P-gp geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.

Çizelge ve Şekil 4.17.'de görüldüğü gibi P-gp geni ifadesi KMS20 hücre hattı 48 saat içerisinde 6 nM bortezomibe maruz kaldığında 3,18 kat, 7,5 nM bortezomibe maruz kaldığında ise 8,64 kat fazla olmaktadır.

Çizelge ve Şekil 4.17.'de görüldüğü gibi KMS28 hücre hattında bortezomib dozunun artışına bağlı olarak 48 saat içerisinde P-gp geni ifadesi tespit edilmemiştir.

Çizelge 4.17. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak P-gp geni RQ sonuçları.

KMS20 48 S.	RQ	KMS28 48 S.	RQ
KONT	1	KONT	0
5 nM	1,29	3 nM	0,00
6 nM	3,18	4 nM	0,00
7,5 nM	8,64	5 nM	0,00



Şekil 4.17. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak P-gp geni RQ sonuçları grafiği.

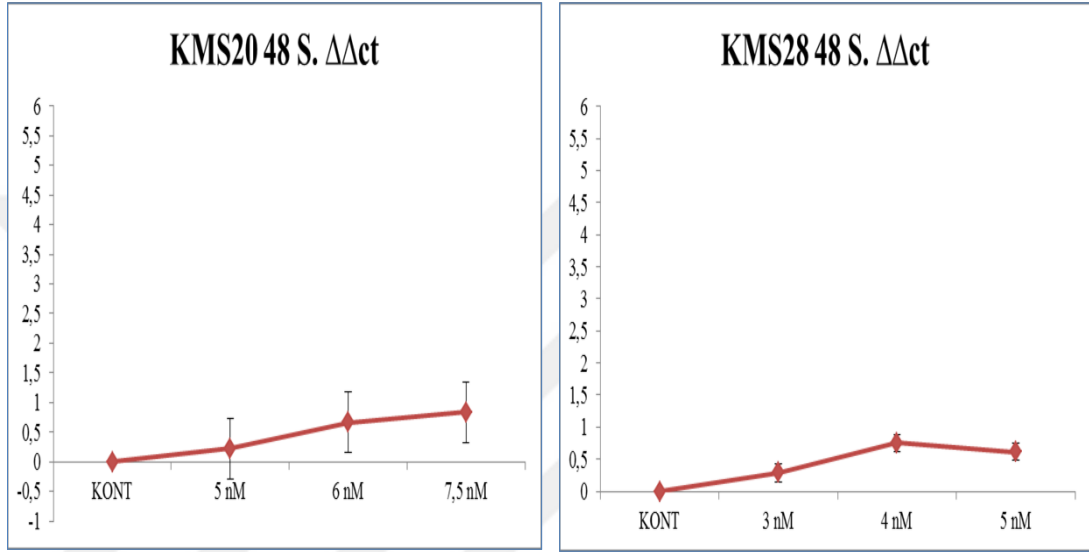
4.4.2.2 MRP-1 Geninin İfade Sonuçları

KMS20 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre gruplar normal dağılıma sahiptir fakat varyansları birbirinden farklı değildir ($p=0,3888$; $r^2=0,3001$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.18.'de görüldüğü gibi bortezomib miktarının arttırılmasıyla MRP-1 geni ifadesinin değişmediğini göstermektedir.

KMS28 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre gruplar normal dağılıma sahiptir ve varyansları birbirinden farklıdır ($p=0,0023$; $r^2=0,822$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.18.'de görüldüğü gibi bortezomib miktarının arttırılmasıyla MRP-1 geni ifadesinin azaldığını göstermektedir.

Çizelge 4.18. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-1 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.

KMS20 48 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht	KMS28 48 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht
KONT	0	0	0	KONT	0	0	0
5 nM	0,22	0,9460	0,51	3 nM	0,29	0,1572	0,14
6 nM	0,66	0,4644	0,51	4 nM	0,75	0,0014	0,14
7,5 nM	0,83	0,3035	0,51	5 nM	0,61	0,0050	0,14



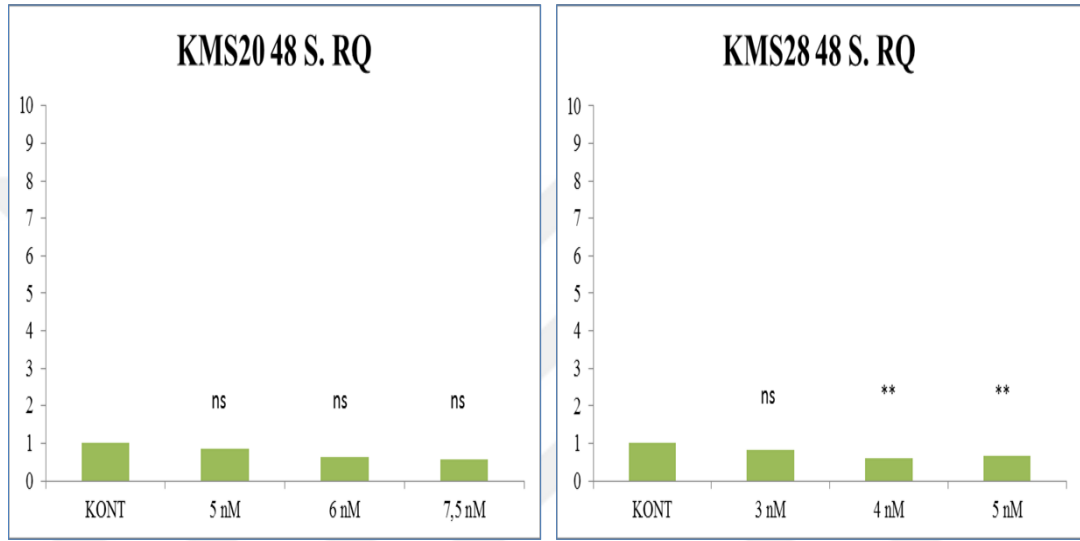
Şekil 4.18. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-1 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.

Çizelge ve Şekil 4.19.'da görüldüğü gibi KMS20 hücre hattında bortezomib dozunun artışına bağlı olarak 48 saat içerisinde MRP-1 geni ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmamıştır.

Çizelge ve Şekil 4.19.'da görüldüğü gibi MRP-1 geni ifadesi KMS28 hücre hattı 48 saat içerisinde 4 nM bortezomibe maruz kaldığında 0,59 kat, 5 nM bortezomibe maruz kaldığında ise 0,65 kat az olmaktadır.

Çizelge 4.19. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-1 geni RQ sonuçları.

KMS20 48 S.	RQ	KMS28 48 S.	RQ
KONT	1	KONT	1
5 nM	0,86	3 nM	0,82
6 nM	0,63	4 nM	0,59
7,5 nM	0,56	5 nM	0,65



Şekil 4.19. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-1 geni RQ sonuçları grafiği.

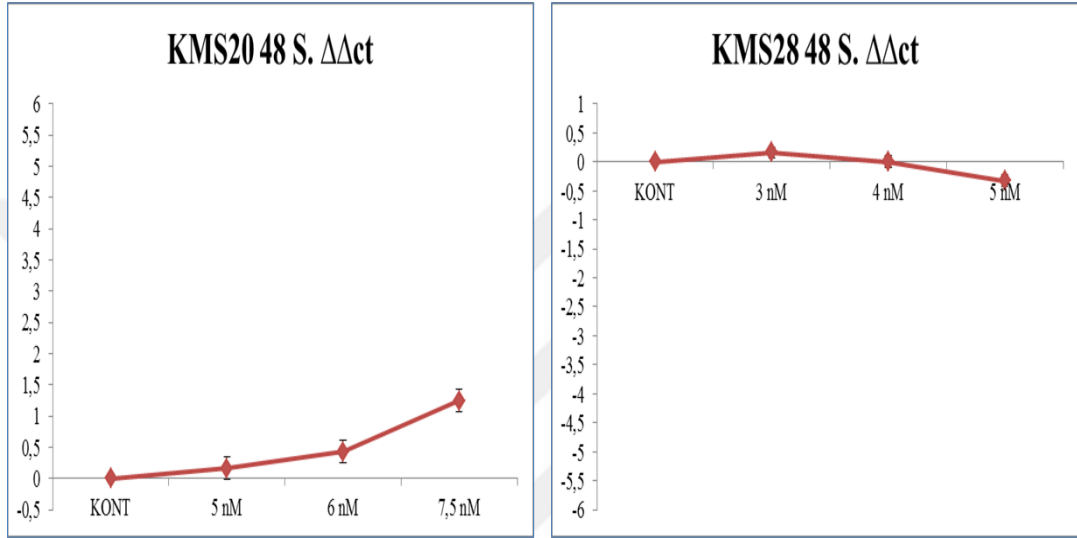
4.4.2.3 MRP-2 Geninin İfade Sonuçları

KMS20 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre gruplar normal dağılıma sahiptir ve varyansları birbirinden farklıdır ($p=0,0005$; $r^2=0,8774$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.20.'de görüldüğü gibi bortezomib miktarının arttırılmasıyla MRP-2 geni ifadesinin azaldığını göstermektedir.

KMS28 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre gruplar normal dağılıma sahiptir ve varyansları birbirinden farklıdır ($p=0,0068$; $r^2=0,7643$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.20.'de görüldüğü gibi bortezomib dozunun IC_{50} değeri üzerindeki 5nM'da MRP-2 geni ifadesinin arttığını göstermektedir.

Çizelge 4.20. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-2 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.

KMS20 48 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht	KMS28 48 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht
KONT	0	0	0	KONT	0	0	0
5 nM	0,16	0,7166	0,18	3 nM	0,16	0,3025	0,10
6 nM	0,43	0,1007	0,18	4 nM	0,00	0,9999	0,10
7,5 nM	1,25	0,0003	0,18	5 nM	-0,33	0,0264	0,10



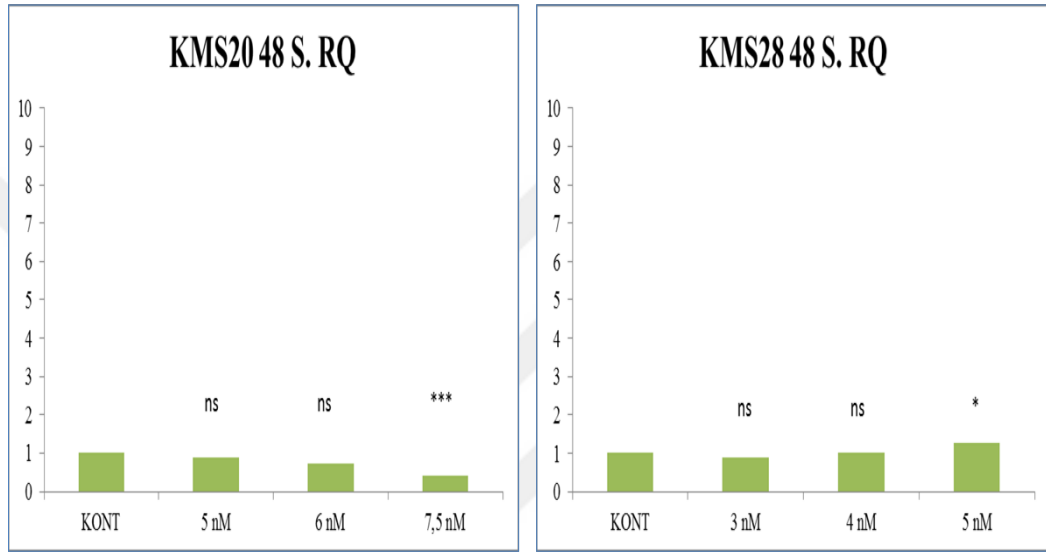
Şekil 4.20. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-2 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.

Çizelge ve Şekil 4.21.'de görüldüğü gibi MRP-2 geni ifadesi KMS20 hücre hattı 48 saat içerisinde 7,5 nM bortezomibe maruz kaldığında ise 0,42 kat az olmaktadır.

Çizelge ve Şekil 4.21.'de görüldüğü gibi MRP-2 geni ifadesi KMS28 hücre hattı 48 saat içerisinde IC_{50} değeri üzerindeki 5 nM bortezomibe maruz kaldığında 1,25 kat fazla olmaktadır, diğer dozlarda ise MRP-2 geni ifadesi artışı gözlenmemiştir.

Çizelge 4.21. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-2 geni RQ sonuçları.

KMS20 48 S.	RQ	KMS28 48 S.	RQ
KONT	1	KONT	1
5 nM	0,90	3 nM	0,89
6 nM	0,74	4 nM	1,00
7,5 nM	0,42	5 nM	1,25



Şekil 4.21. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-2 geni RQ sonuçları grafiği.

4.4.2.4 MRP-3 Geninin İfade Sonuçları

KMS20 hücre hattında bortezomib dozunun artışına bağlı olarak 48 saat içerisinde MRP-3 geni ifadesi tespit edilmemiştir.

KMS28 hücre hattında bortezomib dozunun artışına bağlı olarak 48 saat içerisinde MRP-3 geni ifadesi tespit edilmemiştir.

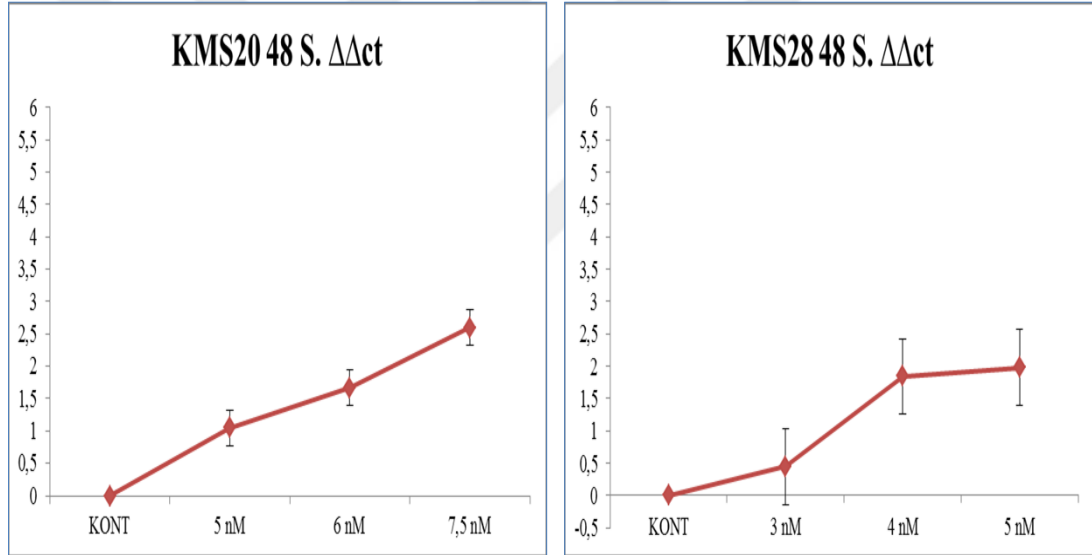
4.4.2.5 MRP-6 Geninin İfade Sonuçları

KMS20 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre gruplar normal dağılıma sahiptir ve varyansları birbirinden farklıdır ($p < 0,0001$; $r^2 = 0,9224$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.22.'de görüldüğü gibi bortezomib miktarının arttırılmasıyla MRP-6 geni ifadesinin azaldığını göstermektedir.

KMS28 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre gruplar normal dağılıma sahiptir ve varyansları birbirinden farklıdır ($p=0,0215$; $r^2=0,6829$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.22.'de görüldüğü gibi bortezomib miktarının arttırılmasıyla MRP-6 geni ifadesinin azaldığını göstermektedir.

Çizelge 4.22. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-6 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.

KMS20 48 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht	KMS28 48 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht
KONT	0	0	0	KONT	0	0	0
5 nM	1,05	0,0125	0,27	3 nM	0,45	0,7905	0,58
6 nM	1,67	0,0008	0,27	4 nM	1,84	0,0339	0,58
7,5 nM	2,60	0,0001	0,27	5 nM	1,98	0,0241	0,58



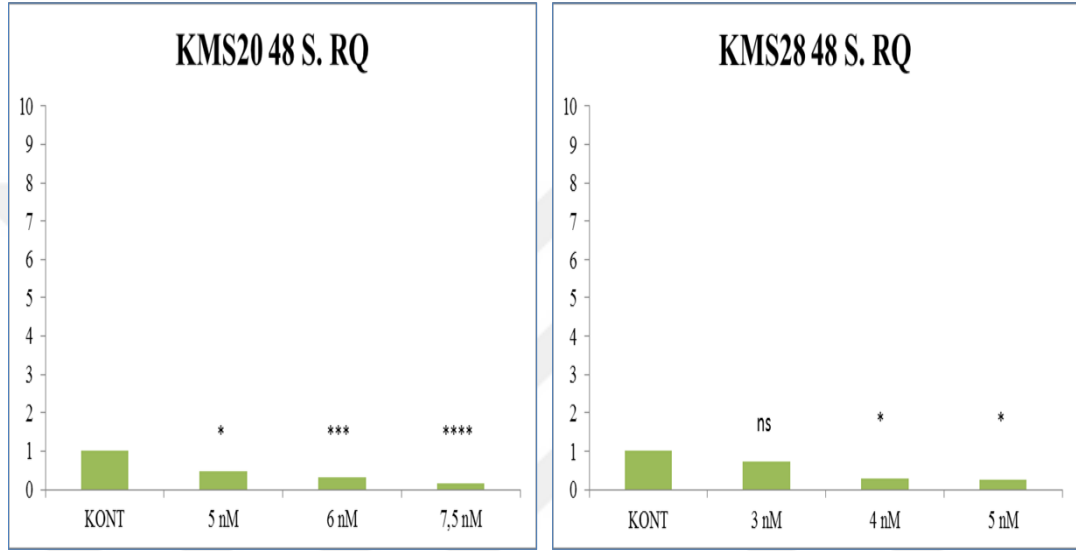
Şekil 4.22. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-6 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.

Çizelge ve Şekil 4.23.'de görüldüğü gibi MRP-6 geni ifadesi KMS20 hücre hattı 48 saat içerisinde 5 nM bortezomibe maruz kaldığında 0,48 kat, 6 nM bortezomibe maruz kaldığında 0,31 kat, 7,5 nM bortezomibe maruz kaldığında ise 0,17 kat az olmaktadır.

Çizelge ve Şekil 4.23.'de görüldüğü gibi MRP-6 geni ifadesi KMS28 hücre hattı 48 saat içerisinde 4 nM bortezomibe maruz kaldığında 0,28 kat, 5 nM bortezomibe maruz kaldığında ise 0,25 kat az olmaktadır.

Çizelge 4.23. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-6 geni RQ sonuçları.

KMS20 48 S.	RQ	KMS28 48 S.	RQ
KONT	1	KONT	1
5 nM	0,48	3 nM	0,73
6 nM	0,31	4 nM	0,28
7,5 nM	0,17	5 nM	0,25



Şekil 4.23. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-6 geni RQ sonuçları grafiği.

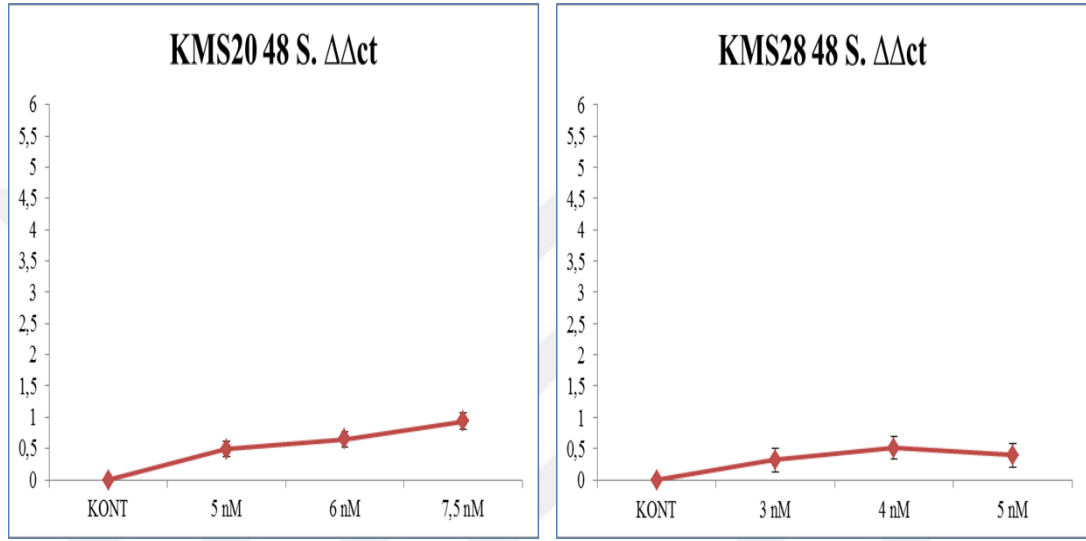
4.4.2.6 MRP-7 Geninin İfade Sonuçları

KMS20 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre gruplar normal dağılıma sahiptir ve varyansları birbirinden farklıdır ($p=0,0005$; $r^2=0,8792$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.24.'de görüldüğü gibi bortezomib miktarının arttırılmasıyla MRP-7 geni ifadesinin azaldığını göstermektedir.

KMS28 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre gruplar normal dağılıma sahiptir fakat varyansları birbirinden farklı değildir ($p=0,1085$; $r^2=0,5123$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.24.'de görüldüğü gibi bortezomib miktarının arttırılmasıyla MRP-7 geni ifadesinin değişmediğini göstermektedir.

Çizelge 4.24. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-7 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.

KMS20 48 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht	KMS28 48 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht
KONT	0	0	0	KONT	0	0	0
5 nM	0,49	0,0119	0,13	3 nM	0,32	0,2729	0,18
6 nM	0,65	0,0022	0,13	4 nM	0,51	0,0587	0,18
7,5 nM	0,94	0,0002	0,13	5 nM	0,39	0,1549	0,18



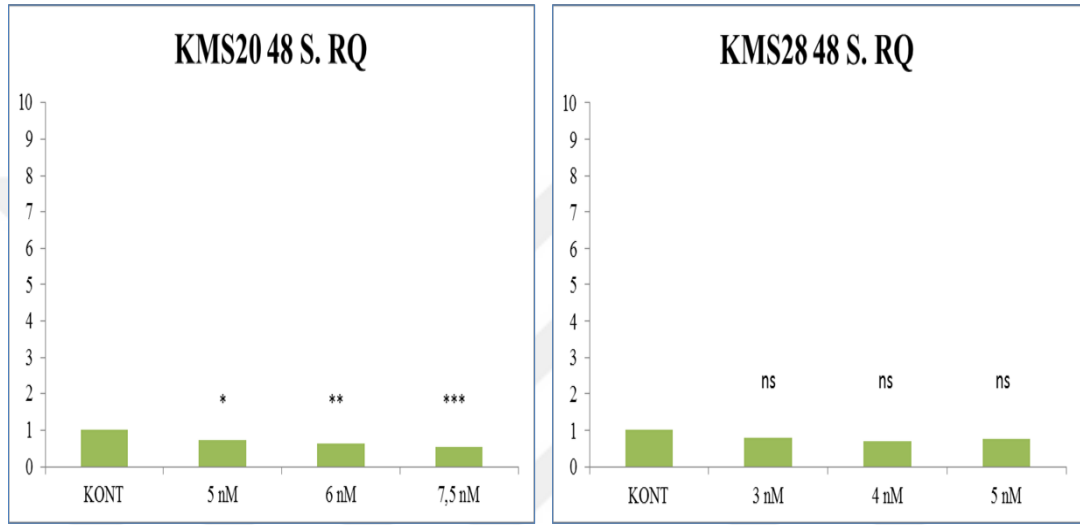
Şekil 4.24. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-7 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.

Çizelge ve Şekil 4.25.'de görüldüğü gibi MRP-7 geni ifadesi KMS20 hücre hattı 48 saat içerisinde 5 nM bortezomibe maruz kaldığında 0,71 kat, 6 nM bortezomibe maruz kaldığında 0,64 kat, 7,5 nM bortezomibe maruz kaldığında ise 0,52 kat az olmaktadır.

Çizelge ve Şekil 4.25.'de görüldüğü gibi KMS28 hücre hattında bortezomib dozunun artışına bağlı olarak 48 saat içerisinde MRP-7 geni ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmamıştır.

Çizelge 4.25. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-7 geni RQ sonuçları.

KMS20 48 S.	RQ	KMS28 48 S.	RQ
KONT	1	KONT	1
5 nM	0,71	3 nM	0,80
6 nM	0,64	4 nM	0,70
7,5 nM	0,52	5 nM	0,76



Şekil 4.25. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MRP-7 geni RQ sonuçları grafiği.

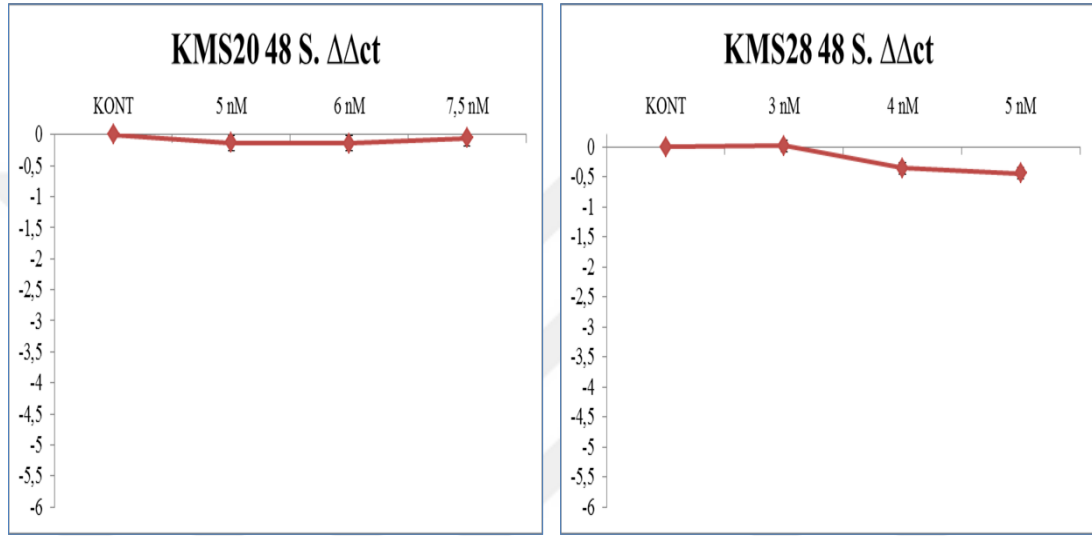
4.4.2.7 GSTP1 Geninin İfade Sonuçları

KMS20 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre gruplar normal dağılıma sahiptir fakat varyansları birbirinden farklı değildir ($p=0,6257$; $r^2=0,1868$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.26.'da görüldüğü gibi bortezomib miktarının arttırılmasıyla GSTP1 gen ifadesinin değişmediğini göstermektedir.

KMS28 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre gruplar normal dağılıma sahiptir ve varyansları birbirinden farklıdır ($p=0,0019$; $r^2=0,8292$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.26.'da görüldüğü gibi bortezomib miktarının arttırılmasıyla GSTP1 gen ifadesinin arttığını göstermektedir.

Çizelge 4.26. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak GSTP1 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.

KMS20 48 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht	KMS28 48 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht
KONT	0	0	0	KONT	0	0	0
5 nM	-0,13	0,5631	0,12	3 nM	0,01	0,9970	0,09
6 nM	-0,14	0,5560	0,12	4 nM	-0,36	0,0128	0,09
7,5 nM	-0,06	0,9307	0,12	5 nM	-0,44	0,0038	0,09



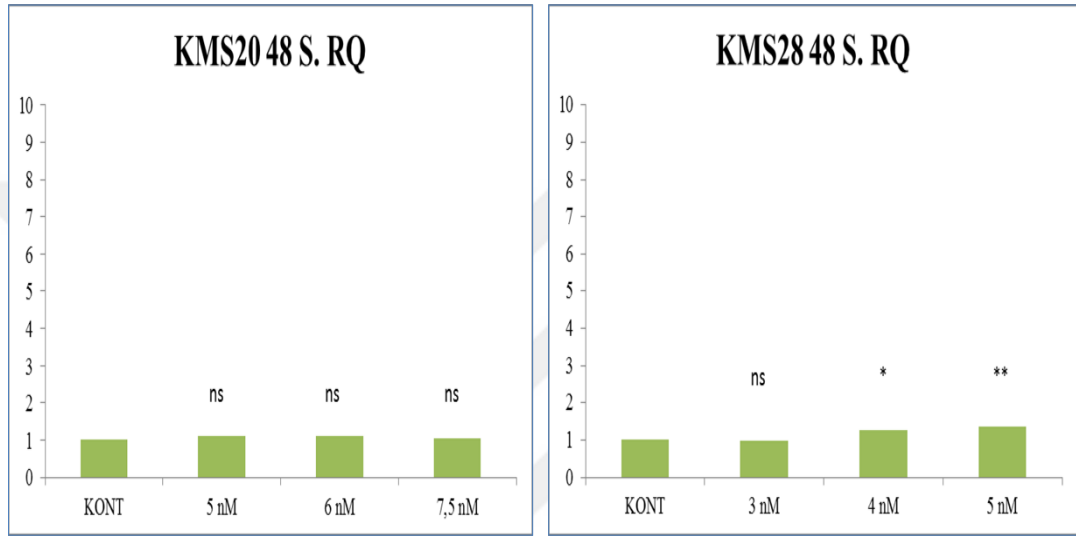
Şekil 4.26. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak GSTP1 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.

Çizelge ve Şekil 4.27.'de görüldüğü gibi KMS20 hücre hattında bortezomib dozunun artışına bağlı olarak 48 saat içerisinde GSTP1 geni ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmamıştır.

Çizelge ve Şekil 4.27.'de görüldüğü gibi GSTP1 geni ifadesi KMS28 hücre hattı 48 saat içerisinde 4 nM bortezomibe maruz kaldığında 1,28 kat, 5 nM bortezomibe maruz kaldığında ise 1,36 kat fazla olmaktadır.

Çizelge 4.27. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak GSTP1 geni RQ sonuçları.

KMS20 48 S.	RQ	KMS28 48 S.	RQ
KONT	1	KONT	1
5 nM	1,10	3 nM	0,99
6 nM	1,10	4 nM	1,28
7,5 nM	1,04	5 nM	1,36



Şekil 4.27. Hücre hatlarının 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak GSTP1 geni RQ sonuçları grafiği.

4.4.3 Hücre Hatlarının Sabit Bortezomib Dozlarında 24 ve 48 Saat Sürelerdeki Gen İfade Analizleri

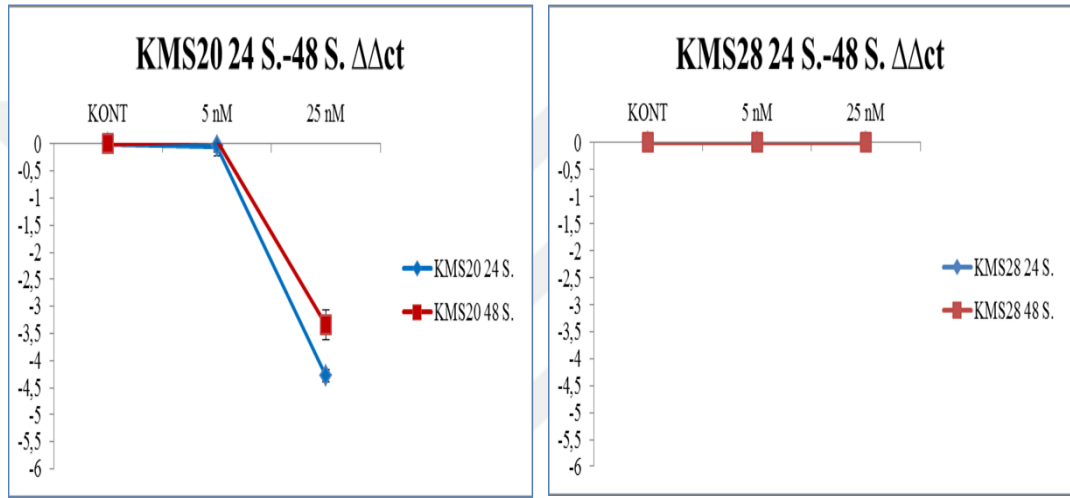
4.4.3.1 P-gp Geninin İfade Sonuçları

KMS20 (bortezomibe dirençli) hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre hem 24 hem de 48 saat için gruplar normal dağılıma sahiptir ve varyansları birbirinden farklıdır ($p < 0,0001$; $r^2 = 0,997$, $p < 0,0001$; $r^2 = 0,969$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.28.'de görüldüğü gibi 24 ve 48 saat için 5 nM bortezomib dozunda herhangi bir farklılık görülmezken, 25 nM bortezomib dozunda P-gp geni ifadesinin arttığını göstermektedir.

KMS28 (bortezomibe hassas) hücre hattında hem 24 hem de 48 saat içerisinde P-gp geni ifadesi tespit edilmemiştir.

Çizelge 4.28. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki P-gp geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.

KMS20 24 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht	KMS28 24 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht
KONT	0	0	0	KONT	0	0	0
5 nM	-0,04	0,8956	0,11	5 nM	0,00	0,0000	0,00
25 nM	-4,28	0,0001	0,11	25 nM	0,00	0,0000	0,00
KMS20 48 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht	KMS28 48 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht
KONT	0	0	0	KONT	0	0	0
5 nM	0,07	0,9581	0,28	5 nM	0,00	0,0000	0,00
25 nM	-3,34	0,0001	0,28	25 nM	0,00	0,0000	0,00

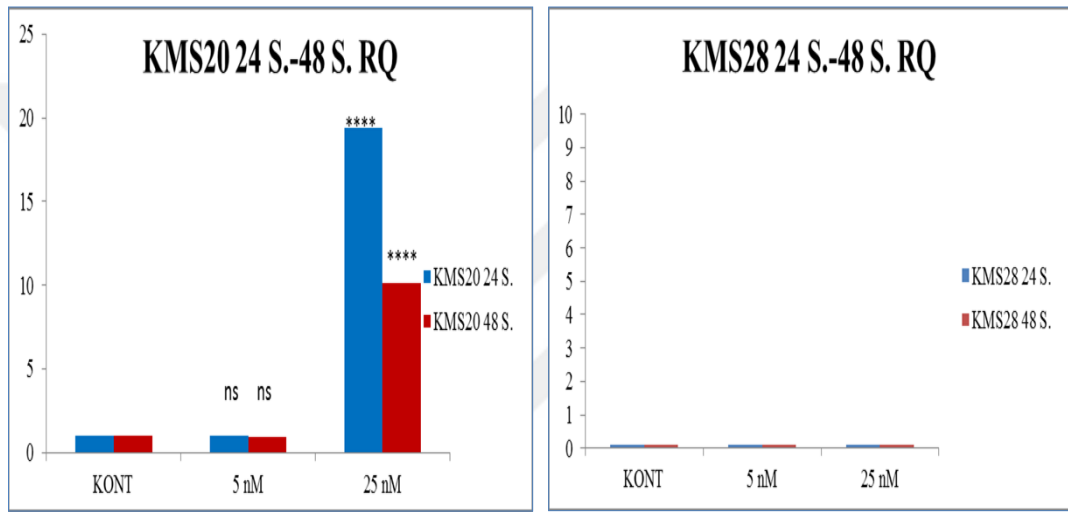


Şekil 4.28. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki P-gp geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.

Çizelge ve Şekil 4.29.'da görüldüğü gibi P-gp geni ifadesi KMS20 hücre hattı 25 nM bortezomib dozuna 24 saat boyunca maruz kaldığında 19,41 kat, 48 saat boyunca maruz kaldığında ise 10,11 kat fazla olmaktadır.

Çizelge 4.29. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki P-gp geni RQ sonuçları.

KMS20 24 S.	RQ	KMS28 24 S.	RQ
KONT	1	KONT	0
5 nM	1,03	5 nM	0,00
25 nM	19,41	25 nM	0,00
KMS20 48 S.	RQ	KMS28 48 S.	RQ
KONT	1	KONT	0
5 nM	0,95	5 nM	0,00
25 nM	10,11	25 nM	0,00



Şekil 4.29. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki P-gp geni RQ sonuçları grafiği.

4.4.3.2 MRP-1 Geninin İfade Sonuçları

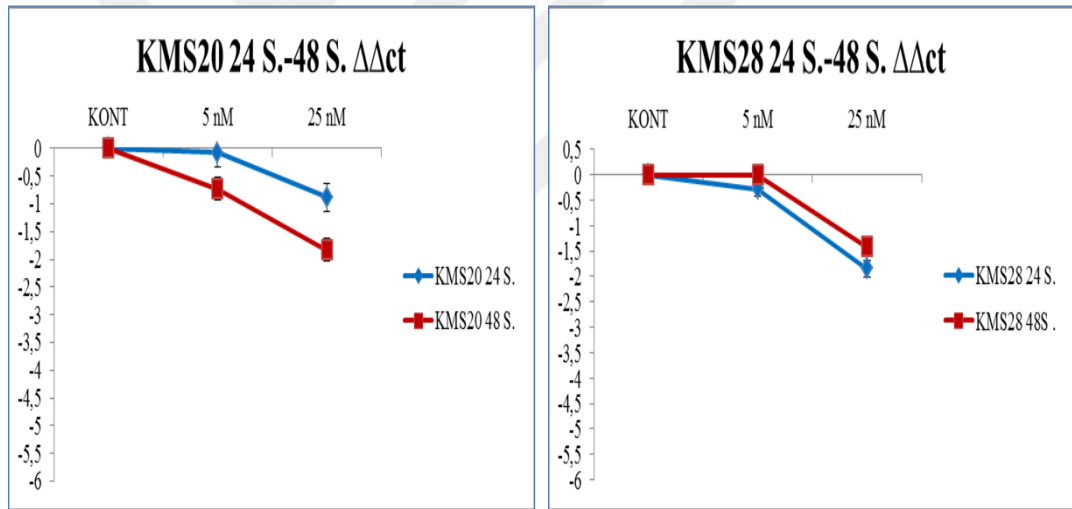
KMS20 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre hem 24 hem de 48 saat için gruplar normal dağılıma sahiptir ve varyansları birbirinden farklıdır ($p=0,0216$; $r^2=0,722$, $p=0,0003$; $r^2=0,932$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.30.'da görüldüğü gibi 24 saat için 5 nM bortezomib dozunda herhangi bir farklılık görülmezken, 25 nM bortezomib dozunda MRP-1 geni ifadesinin arttığını, 48 saat için hem 5 nM'da hem de 25 nM bortezomib dozunda MRP-1 geni ifadesinin arttığını göstermektedir.

KMS28 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre hem 24 hem de 48 saat için gruplar normal dağılıma sahiptir ve varyansları birbirinden farklıdır ($p<0,0001$; $r^2=0,964$, $p<0,0001$; $r^2=0,960$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve

Şekil 4.30.'da görüldüğü gibi 24 ve 48 saat için 5 nM bortezomib dozunda herhangi bir farklılık görülmezken, 25 nM bortezomib dozunda MRP-1 geni ifadesinin arttığını göstermektedir.

Çizelge 4.30. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-1 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.

KMS20 24 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht	KMS28 24 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht
KONT	0	0	0	KONT	0	0	0
5 nM	-0,08	0,9255	0,25	5 nM	-0,27	0,2201	0,16
25 nM	-0,89	0,0209	0,25	25 nM	-1,85	0,0001	0,16
KMS20 48 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht	KMS28 48 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht
KONT	0	0	0	KONT	0	0	0
5 nM	-0,73	0,0198	0,20	5 nM	0,00	0,9999	0,14
25 nM	-1,83	0,0002	0,20	25 nM	-1,42	0,0001	0,14



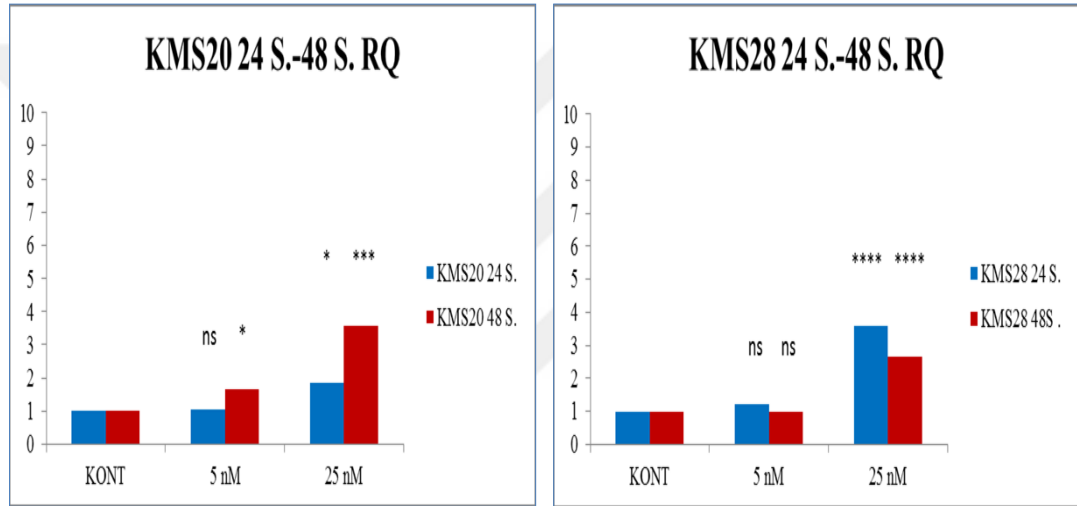
Şekil 4.30. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-1 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.

Çizelge ve Şekil 4.31.'de görüldüğü gibi MRP-1 geni ifadesi KMS20 hücre hattı 25 nM bortezomib dozuna 24 saat boyunca maruz kaldığında 1,85 kat, 5 nM bortezomib dozuna 48 saat boyunca maruz kaldığında 1,66 kat ve 25 nM bortezomib dozuna 48 saat boyunca maruz kaldığında ise 3,56 kat fazla olmaktadır.

Çizelge ve Şekil 4.31.'de görüldüğü gibi MRP-1 geni ifadesi KMS28 hücre hattı 25 nM bortezomib dozuna 24 saat boyunca maruz kaldığında 3,60 kat, 25 nM bortezomib dozuna 48 saat boyunca maruz kaldığında ise 2,67 kat fazla olmaktadır.

Çizelge 4.31. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-1 geni RQ sonuçları.

KMS20 24 S.	RQ	KMS28 24 S.	RQ
KONT	1	KONT	1
5 nM	1,06	5 nM	1,21
25 nM	1,85	25 nM	3,60
KMS20 48 S.	RQ	KMS28 48 S.	RQ
KONT	1	KONT	1
5 nM	1,66	5 nM	1,00
25 nM	3,56	25 nM	2,67



Şekil 4.31. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-1 geni RQ sonuçları grafiği.

4.4.3.3 MRP-2 Geninin İfade Sonuçları

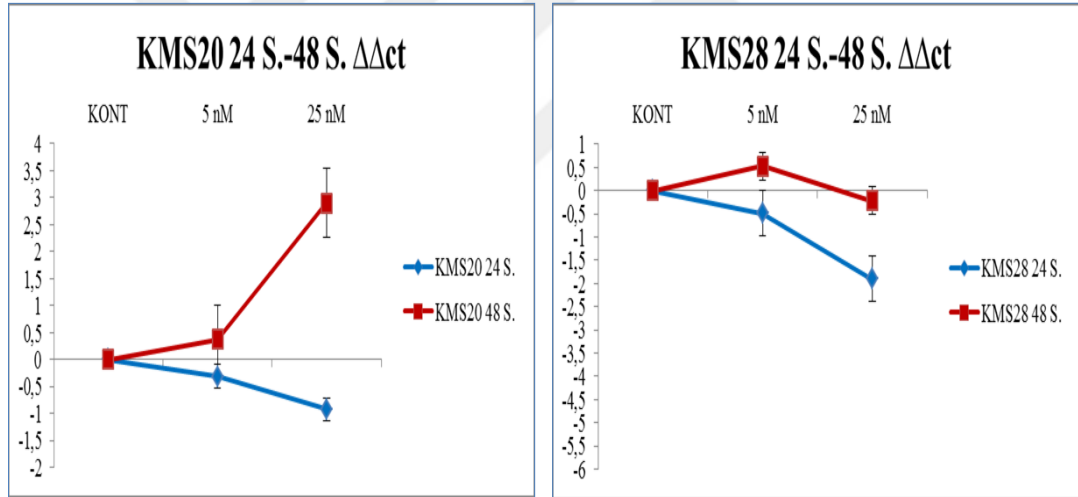
KMS20 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre hem 24 hem de 48 saat için gruplar normal dağılıma sahiptir ve varyansları birbirinden farklıdır ($p=0,0137$; $r^2=0,761$, $p=0,0076$; $r^2=0,804$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.32’de görüldüğü gibi 24 ve 48 saat için 5 nM bortezomib dozunda herhangi bir farklılık görülmezken, 25 nM bortezomib dozunda MRP-2 geni ifadesinin değiştiğini göstermektedir.

KMS28 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre 24 saat için gruplar normal dağılıma sahip ve varyansları birbirinden farklıyken 48 saat için gruplar normal dağılıma sahip fakat varyansları birbirinden farklı değildir.

($p=0,0190$; $r^2=0,733$, $p=0,1065$; $r^2=0,526$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.32.'de görüldüğü gibi 24 saat için 5 nM bortezomib dozunda herhangi bir farklılık görülmezken, 25 nM bortezomib dozunda MRP-2 geni ifadesinin arttığını göstermektedir.

Çizelge 4.32. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-2 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.

KMS20 24 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht	KMS28 24 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht
KONT	0	0	0	KONT	0	0	0
5 nM	-0,32	0,3095	0,22	5 nM	-0,49	0,5289	0,49
25 nM	-0,92	0,0091	0,22	25 nM	-1,90	0,0140	0,49
KMS20 48 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht	KMS28 48 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht
KONT	0	0	0	KONT	0	0	0
5 nM	0,37	0,7936	0,64	5 nM	0,53	0,2097	0,30
25 nM	2,90	0,0070	0,64	25 nM	-0,22	0,6978	0,30



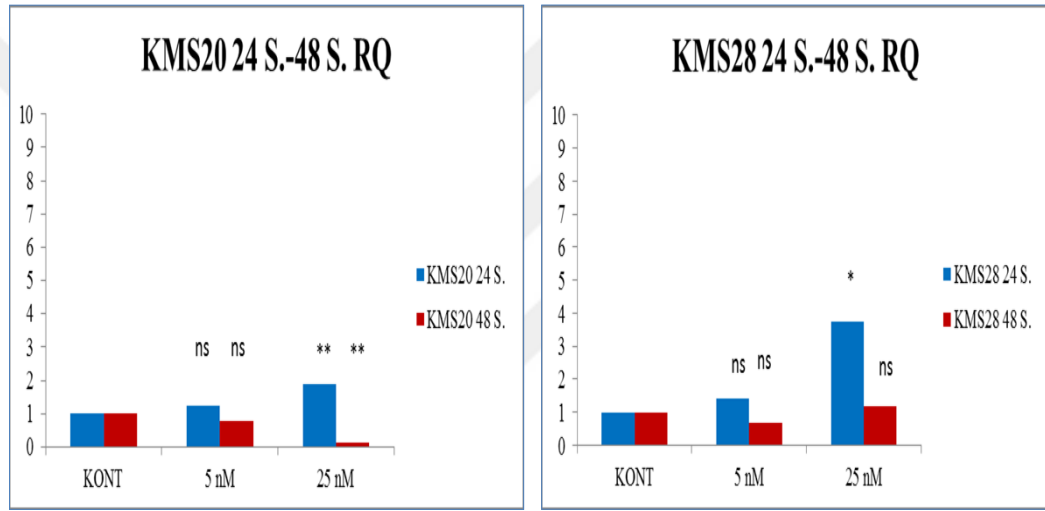
Şekil 4.32. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-2 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.

Çizelge ve Şekil 4.33.'de görüldüğü gibi MRP-2 geni ifadesi KMS20 hücre hattı 25 nM bortezomib dozuna 24 saat boyunca maruz kaldığında 1,90 kat fazla, 25 nM bortezomib dozuna 48 saat boyunca maruz kaldığında ise 0,13 kat az olmaktadır.

Çizelge ve Şekil 4.33.'de görüldüğü gibi MRP-2 geni ifadesi KMS28 hücre hattı 25 nM bortezomib dozuna 24 saat boyunca maruz kaldığında 3,74 kat fazla olmaktadır.

Çizelge 4.33. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-2 geni RQ sonuçları.

KMS20 24 S.	RQ	KMS28 24 S.	RQ
KONT	1	KONT	1
5 nM	1,25	5 nM	1,41
25 nM	1,90	25 nM	3,74
KMS20 48 S.	RQ	KMS28 48 S.	RQ
KONT	1	KONT	1
5 nM	0,77	5 nM	0,69
25 nM	0,13	25 nM	1,16



Şekil 4.33. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-2 geni RQ sonuçları grafiği.

4.4.3.4 MRP-3 Geninin İfade Sonuçları

KMS20 hücre hattında sabit bortezomib dozlarında hem 24 hem de 48 saat içerisinde MRP-3 geni ifadesi tespit edilmemiştir.

KMS28 hücre hattında hem 24 hem de 48 saat içerisinde MRP-3 geni ifadesi tespit edilmemiştir.

4.4.3.5 MRP-6 Geninin İfade Sonuçları

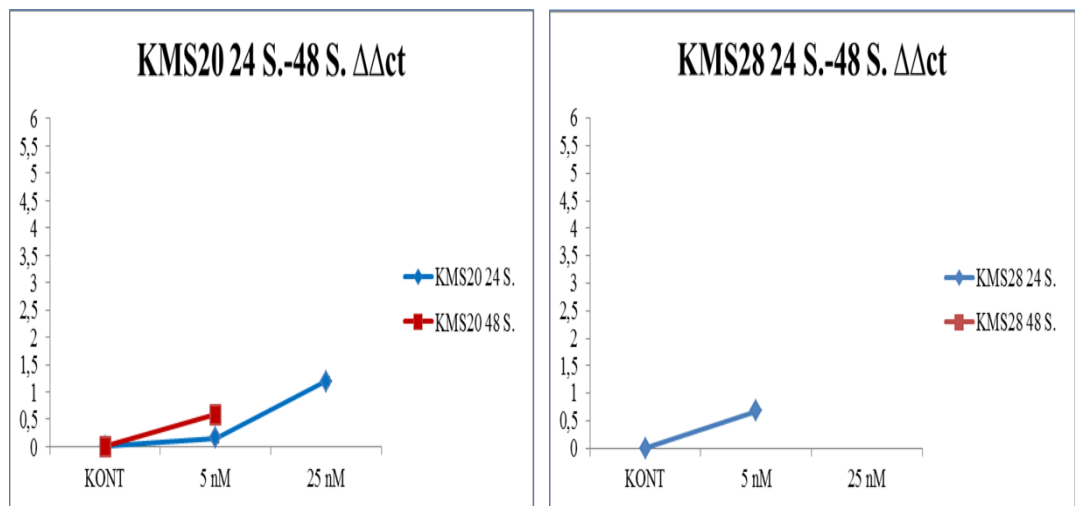
KMS20 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre hem 24 hem de 48 saat için gruplar normal dağılıma sahiptir ve varyansları birbirinden

farklıdır ($p<0,0001$; $r^2=0,976$, $p=0,0063$; $r^2=0,874$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.34.'de görüldüğü gibi 24 saat için 5 nM bortezomib dozunda herhangi bir farklılık görülmezken, 25 nM bortezomib dozunda ve 48 saat için 5 nM bortezomib dozunda MRP-6 geni ifadesinin azaldığını, 48 saat için 25 nM'da ise MRP-6 geni ifadesinin tespit edilmediğini göstermektedir.

KMS28 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre 24 saat için gruplar normal dağılıma sahip fakat varyansları birbirinden farklı değildir ($p=0,3111$; $r^2=0,251$), 48 saat içerisinde ise MRP-6 geni ifadesi tespit edilmemiştir. Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.34.'de görüldüğü gibi sabit bortezomib dozlarında 24 saat içerisinde MRP-6 geni ifadesinin değişmediğini göstermektedir.

Çizelge 4.34. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-6 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.

KMS20 24 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht	KMS28 24 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht
KONT	0	0	0	KONT	0	0	
5 nM	0,16	0,1774	0,08	5 nM	0,68	0,3111	
25 nM	1,19	0,0001	0,08	25 nM			
KMS20 48 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht	KMS28 48 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht
KONT	0	0	0	KONT			
5 nM	0,59	0,0063		5 nM			
25 nM				25 nM			

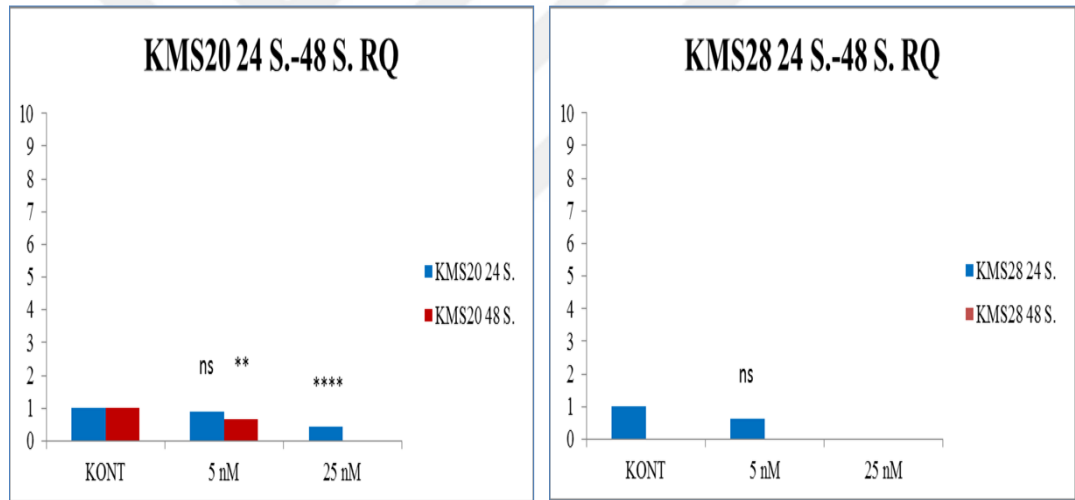


Şekil 4.34. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-6 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.

Çizelge ve Şekil 4.35.'de görüldüğü gibi MRP-6 geni ifadesi KMS20 hücre hattı 25 nM bortezomib dozuna 24 saat boyunca maruz kaldığında 0,44 kat, 5 nM bortezomib dozuna 48 saat boyunca maruz kaldığında ise 0,67 kat az olmaktadır.

Çizelge 4.35. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-6 geni RQ sonuçları.

KMS20 24 S.	RQ	KMS28 24 S.	RQ
KONT	1	KONT	1
5 nM	0,90	5 nM	0,62
25 nM	0,44	25 nM	
KMS20 48 S.	RQ	KMS28 48 S.	RQ
KONT	1	KONT	
5 nM	0,67	5 nM	
25 nM		25 nM	



Şekil 4.35. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-6 geni RQ sonuçları grafiği.

4.4.3.6 MRP-7 Geninin İfade Sonuçları

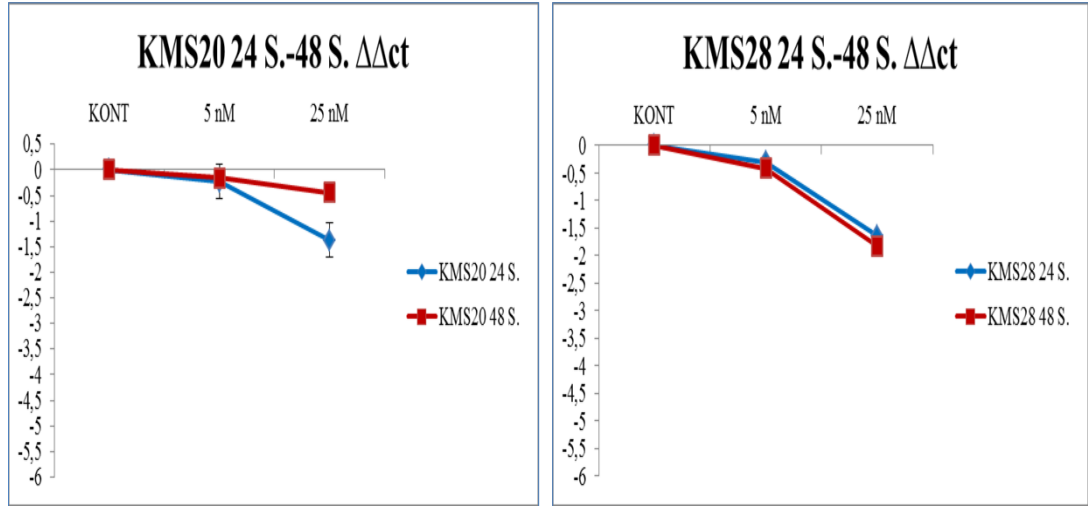
KMS20 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre 24 saat için gruplar normal dağılıma sahip ve varyansları birbirinden farklıyken 48 saat için gruplar normal dağılıma sahip fakat varyansları birbirinden farklı değildir ($p=0,0140$; $r^2=0,759$, $p=0,1069$; $r^2=0,525$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.36.'da görüldüğü gibi 24 saat için 5 nM bortezomib dozunda herhangi bir farklılık

görülmezken, 25 nM bortezomib dozunda MRP-7 geni ifadesinin arttığını göstermektedir.

KMS28 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre hem 24 hem de 48 saat için gruplar normal dağılıma sahiptir ve varyansları birbirinden farklıdır ($p<0,0001$; $r^2=0,993$, $p<0,0001$; $r^2=0,962$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.36.'da görüldüğü gibi 24 saat için hem 5 hem de 25 nM bortezomib dozunda MRP-7 geni ifadesinin arttığını, 48 saat için 5 nM bortezomib dozunda herhangi bir farklılık görülmezken 25 nM'da ise MRP-7 geni ifadesinin arttığını göstermektedir.

Çizelge 4.36. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-7 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.

KMS20 24 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht	KMS28 24 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht
KONT	0	0	0	KONT	0	0	0
5 nM	-0,23	0,7269	0,34	5 nM	-0,30	0,0041	0,06
25 nM	-1,37	0,0118	0,34	25 nM	-1,64	0,0001	0,06
KMS20 48 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht	KMS28 48 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht
KONT	0	0	0	KONT	0	0	0
5 nM	-0,16	0,5887	0,17	5 nM	-0,41	0,0640	0,15
25 nM	-0,44	0,0756	0,17	25 nM	-1,82	0,0001	0,15



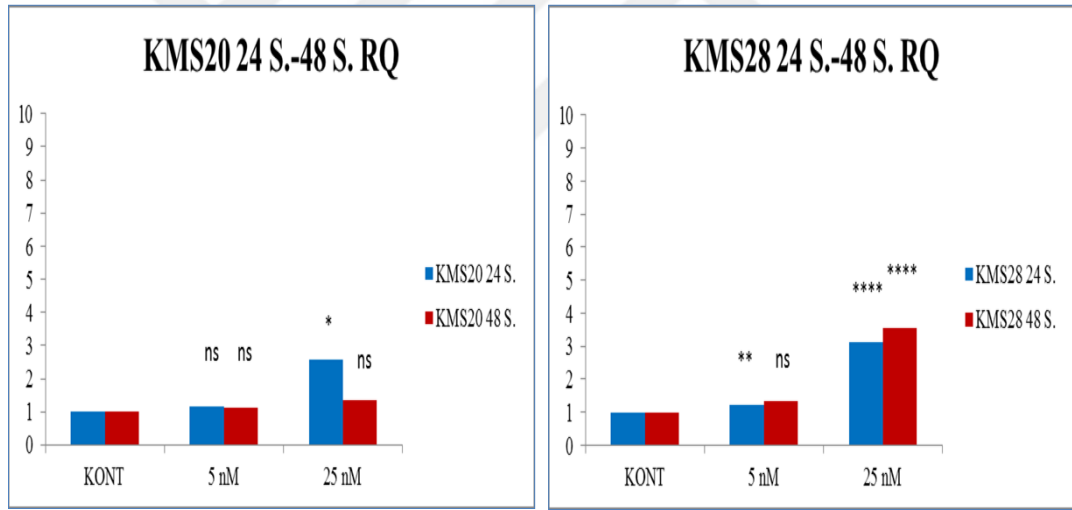
Şekil 4.36. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-7 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.

Çizelge ve Şekil 4.37.'de görüldüğü gibi MRP-7 geni ifadesi KMS20 hücre hattı 25 nM bortezomib dozuna 24 saat boyunca maruz kaldığında 2,58 kat fazladır.

Çizelge ve Şekil 4.37.'de görüldüğü gibi MRP-7 geni ifadesi KMS28 hücre hattı 5 nM bortezomib dozuna 24 saat boyunca maruz kaldığında 1,23 kat, 25 nM bortezomib dozuna 24 saat boyunca maruz kaldığında 3,12 kat, 25 nM bortezomib dozuna 48 saat boyunca maruz kaldığında ise 3,54 kat fazla olmaktadır.

Çizelge 4.37. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-7 geni RQ sonuçları.

KMS20 24 S.	RQ	KMS28 24 S.	RQ
KONT	1	KONT	1
5 nM	1,17	5 nM	1,23
25 nM	2,58	25 nM	3,12
KMS20 48 S.	RQ	KMS28 48 S.	RQ
KONT	1	KONT	1
5 nM	1,12	5 nM	1,33
25 nM	1,35	25 nM	3,54



Şekil 4.37. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MRP-7 geni RQ sonuçları grafiği.

4.4.3.7 GSTP1 Geninin İfade Sonuçları

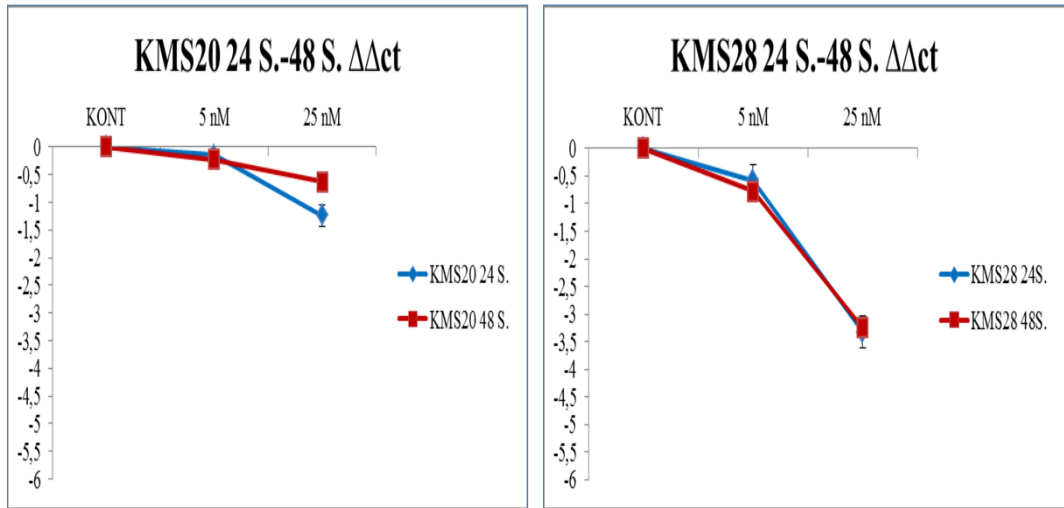
KMS20 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre hem 24 hem de 48 saat için gruplar normal dağılıma sahiptir ve varyansları birbirinden farklıdır ($p=0,0015$; $r^2=0,887$, $p=0,0064$; $r^2=0,814$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.38.'de görüldüğü gibi 24 ve 48 saat için 5 nM bortezomib dozunda herhangi

bir farklılık görülmezken, 25 nM bortezomib dozunda GSTP1 geni ifadesinin arttığını göstermektedir.

KMS28 hücre hattı için qRT-PCR sonuçlarına yapılan ANOVA testine göre hem 24 hem de 48 saat için gruplar normal dağılıma sahiptir ve varyansları birbirinden farklıdır ($p<0,0001$; $r^2=0,961$, $p<0,0001$; $r^2=0,996$). Dunnet testi sonuçları Çizelge ve Şekil 4.38.'de görüldüğü gibi 24 saat için 5 nM bortezomib dozunda herhangi bir farklılık görülmezken, 25 nM'da GSTP1 geni ifadesinin arttığını, 48 saat için ise hem 5 hem de 25 nM bortezomib dozunda GSTP1 geni ifadesinin arttığını göstermektedir.

Çizelge 4.38. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki GSTP1 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları, p ve standart hata değerleri.

KMS20 24 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht	KMS28 24 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht
KONT	0	0	0	KONT	0	0	0
5 nM	-0,15	0,6878	0,20	5 nM	-0,57	0,1606	0,29
25 nM	-1,24	0,0014	0,20	25 nM	-3,33	0,0001	0,29
KMS20 48 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht	KMS28 48 S.	$\Delta\Delta Ct$	p	stdht
KONT	0	0	0	KONT	0	0	0
5 nM	-0,23	0,1877	0,12	5 nM	-0,77	0,0003	0,09
25 nM	-0,63	0,0041	0,12	25 nM	-3,25	0,0001	0,09



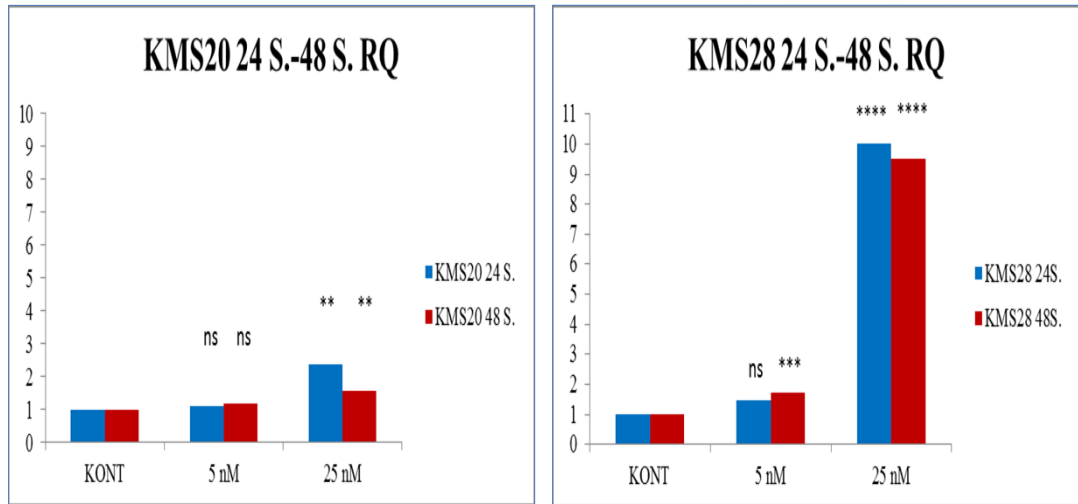
Şekil 4.38. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki GSTP1 geni $\Delta\Delta Ct$ sonuçları grafiği.

Çizelge ve Şekil 4.39.'da görüldüğü gibi GSTP1 geni ifadesi KMS20 hücre hattı 25 nM bortezomib dozuna 24 saat boyunca maruz kaldığında 2,36 kat, 25 nM bortezomib dozuna 48 saat boyunca maruz kaldığında 1,55 kat fazla olmaktadır.

Çizelge ve Şekil 4.39.'da görüldüğü gibi GSTP1 geni ifadesi KMS28 hücre hattı 25 nM bortezomib dozuna 24 saat boyunca maruz kaldığında 10,04, 5 nM bortezomib dozuna 48 saat boyunca maruz kaldığında 1,71 kat ve 25 nM bortezomib dozuna 48 saat boyunca maruz kaldığında ise 9,51 kat fazla olmaktadır.

Çizelge 4.39. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki GSTP1 geni RQ sonuçları.

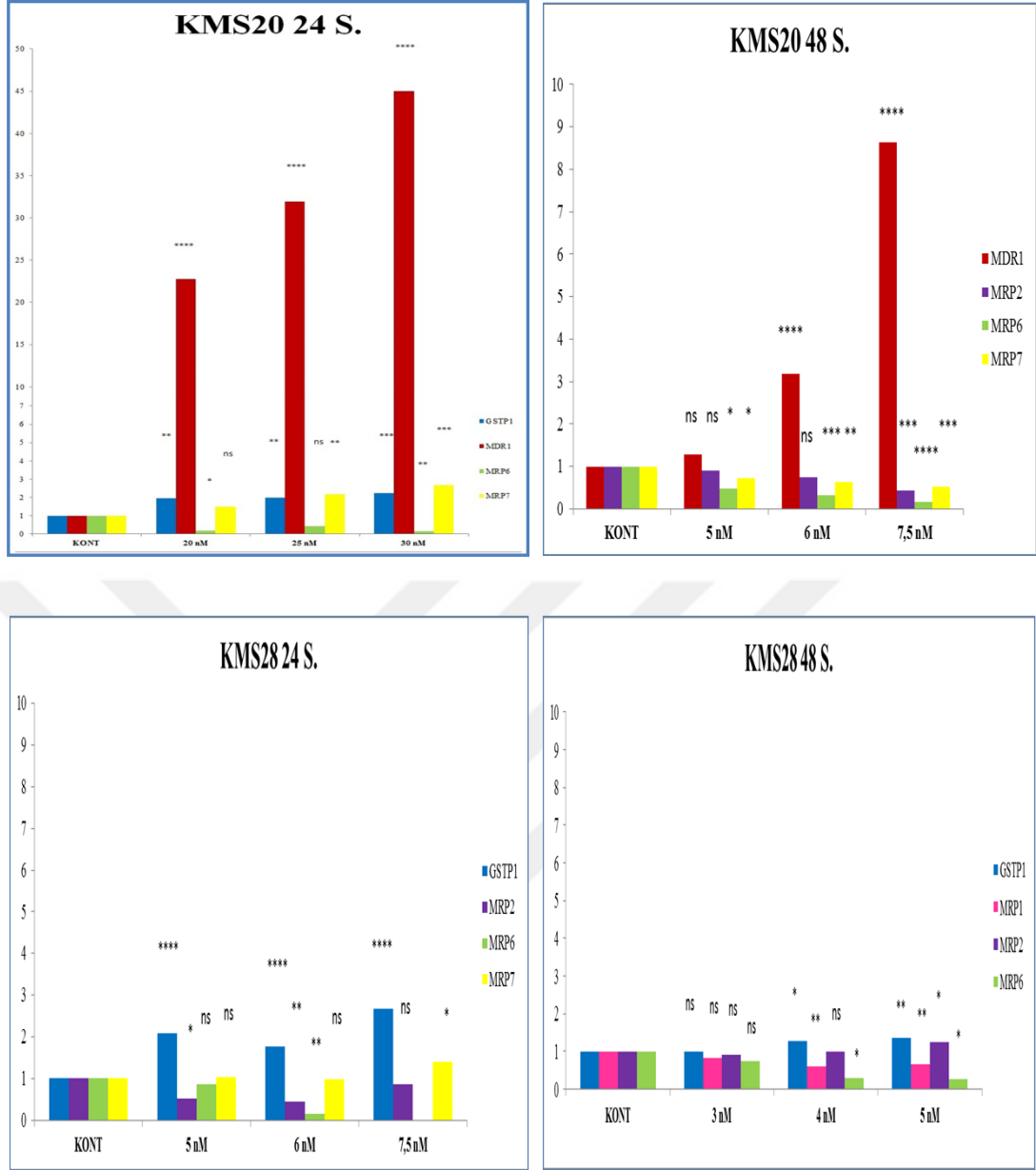
KMS20 24 S.	RQ	KMS28 24 S.	RQ
KONT	1	KONT	1
5 nM	1,11	5 nM	1,49
25 nM	2,36	25 nM	10,04
KMS20 48 S.	RQ	KMS28 48 S.	RQ
KONT	1	KONT	1
5 nM	1,17	5 nM	1,71
25 nM	1,55	25 nM	9,51



Şekil 4.39. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki GSTP1 geni RQ sonuçları grafiği.

4.4.4. Hücre Hatlarındaki Gen İfade Düzeylerinin Genel Değerlendirilmesi

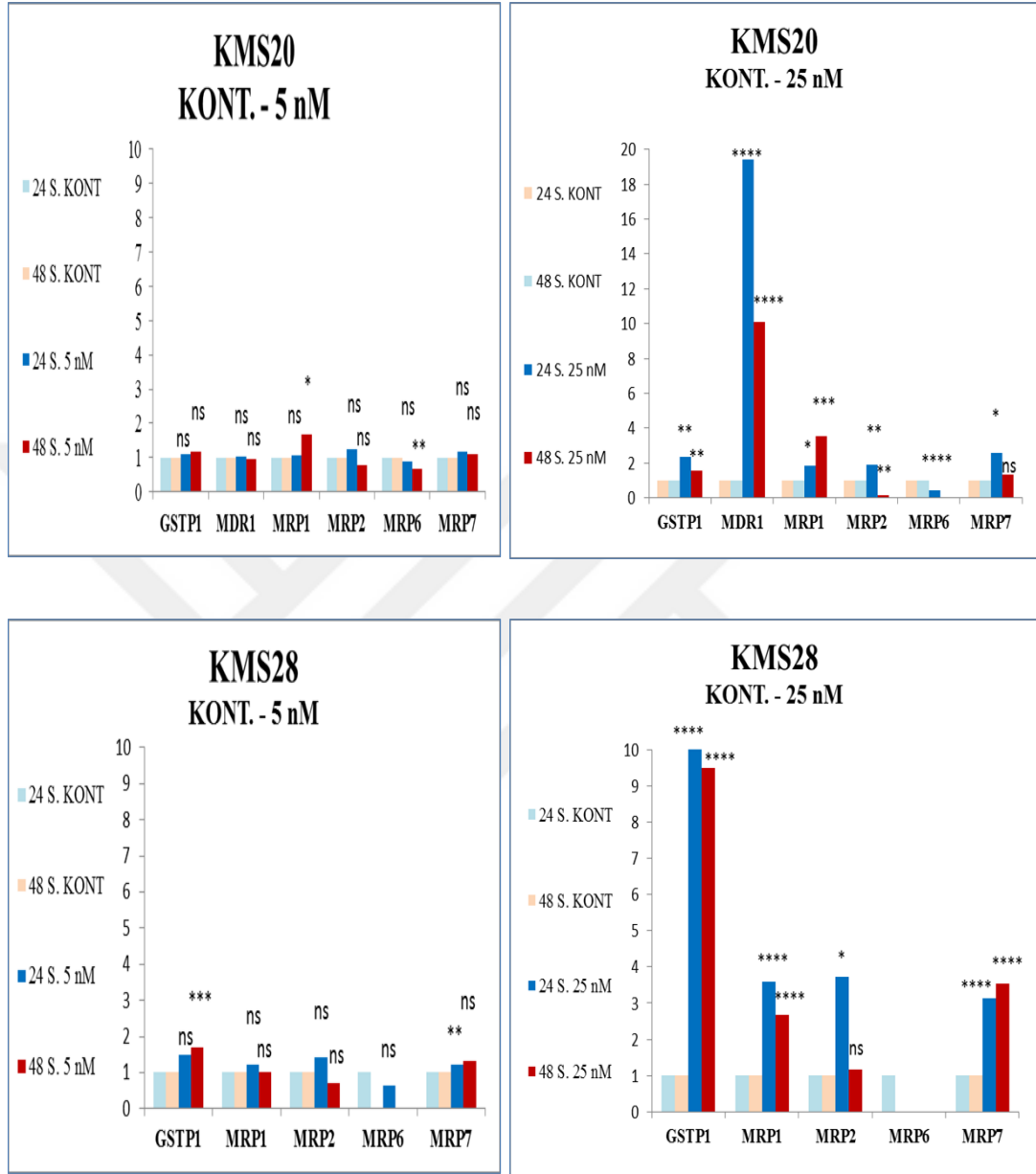
Çalışılan tüm genlerin her iki hücre hattında ifade düzeyleri toplu olarak Şekil 4.40'daki grafiklerde karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.40. Hücre hatlarının 24 ve 48 saat içerisinde Bortezomib doz artışına bağlı olarak MDR ilişkili genlerin ifade düzeylerinin grafiği.

Şekil 4.40.'da görüldüğü gibi KMS20 (bortezomibe dirençli) hücre hattında 24 saat içerisinde bortezomib dozunun artışına bağlı olarak P-gp, MRP-7 ve GSTP1 geni ifadeleri artarken MRP6 geni ifadesi azalmaktadır. Bu hücre hattına 48 saatlik bortezomib uygulanmasında ise P-gp geni ifadesi artarken MRP-2, MRP-6 ve MRP-7 geni ifadeleri azalmaktadır. KMS28 (bortezomibe hassas) hücre hattında 24 saat içerisinde bortezomib dozunun artışına bağlı olarak GSTP1 ve MRP-7 geni ifadeleri artarken MRP-2 ve MRP-6 geni ifadelerinin azaldığı bulunmuştur. Bu hücre hattına

48 saatlik bortezomib uygulanması sonucunda ise GSTP1 ve MRP-2 geni ifadeleri artarken MRP-1 ve MRP-6 geni ifadeleri azalmaktadır.



Şekil 4.41. Hücre hatlarının sabit Bortezomib dozlarında 24 ve 48 saat sürelerdeki MDR ilişkili genlerin ifade düzeylerinin grafiği.

Şekil 4.41.'da görüldüğü gibi KMS20 hücre hattının bortezomibin yüksek dozlarına uzun süre maruz bırakılmasıyla GSTP1, P-gp, MRP-1, MRP-2 ve MRP-7 geni ifadeleri artarken MRP-6 geni ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir. KMS28 hücre hattının bortezomibin yüksek dozlarına uzun süre maruz bırakılmasıyla ise GSTP1, MRP-1, MRP-2 ve MRP-7 geni ifadeleri artarken MRP-6 geni ifadesinin azaldığı bulunmuştur.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Multiple myeloma, kemik iliğinde malign plazma hücrelerinin anormal birikimiyle karakterize olan hematolojik bir kanser türüdür (Kumar, 2010). Kanser tedavisinde uygulanan en yaygın ve etkili yöntem kemoterapidir. Bortezomib bu hastalığın tedavisinde klinikte yaygın olarak kullanılan, FDA tarafından onaylı en etkin kemoterapötik ilaçtır. Ancak hastalar, myeloma tedavisi boyunca ilkin terapilere kısa sürede cevap verebilirken bir süre sonra bortezomibe karşı dirençlilik (MDR) geliştirmektedir. Bu duruma neden olan dirençli hücreler ilk teşhis aşamasında bile var olabilir veya spontan mutasyonlarla sonradan gelişebilir (Tomida ve Tsuruo, 2001). Dirençli hücreler tedavi boyunca seçilerek hassas hücrelerden daha fazla büyür ve yayılır. Bu durum sıklıkla yaşanmakta ve tedavi sonrasında myelomanın tekrarlamasına neden olmaktadır. Bortezomib dirençliliği, MM hastaları üzerinde bortezomibin beklenen etkisini gösterememesine ve hastalığın ilerlemesine neden olmaktadır. Gözlenen bu dirençlilik; MDR genlerinin yüksek ifadesi, detoksifikasyon işlevinde artış, apoptozisin engellenmesi, hücre döngüsü düzenleme faktörlerindeki değişiklikler, ilaç-hedef ilişkisinde değişiklikler, kromozomal anormallik, gen mutasyonu, epigenetik değişiklikler ve sinyal yollarının aşırı aktivasyonunu içeren birçok genomik veya onkogenomik faktörler ilaç direnci gelişiminde rol oynamaktadır (Solay vd., 2000; Liu vd., 2001; Choi, 2005; Sau vd., 2010; Chapman vd., 2011; Heuck vd., 2013).

Bortezomib, bir dipeptid boranik asit analogu olarak MM tedavisinde klinik denemelerde değerlendirilen en başarılı proteozom inhibitörüdür. Geri dönüşlü bir proteozom inhibitörü olup esas mekanizmasında alışılmadık bir grup olan boronik asidi kullanır. Belirli zaman aralığında yapılan hücre kültürü deneylerinde bortezomibin hücreden çıkış oranının oldukça yavaş olduğu tespit edilmiştir ve bu durum kanser hücrelerindeki inhibisyonunun aslında geri dönüşsüz olduğunu göstermektedir. Bortezomibin klinik etkilerinden biri de bu düşük çıkış oranıdır, bir kez kırmızı kan hücrelerindeki proteozoma bağlandığında bir daha salıverilmez (Kisselev vd., 2012). Fakat normal hücrelerde geri dönüşlü bağlanma özelliğinden dolayı proteozom inhibisyonu etkisi görülmez (Adams, 2003). Tüm bunlar değerlendirildiğinde bortezomib, ilk olarak tümör hücreleri ve normal hücreler

arasında elverişli bir seçicilik sağlar ve bu da iyi bir antikanser ilacı olmada önemli bir kriterdir.

Yapılan tez çalışmasında multiple myeloma KMS20 (bortezomibe dirençli) ve KMS28 (bortezomibe hassas) hücre hatlarında MDR ile ilişkili olan genlerden P-gp, MRP-1, MRP-2, MRP-3, MRP-6, MRP-7 ve GSTP1'in genlerinin ifadelerindeki değişiklikler araştırılmıştır. Bortezomib dozunun artışına bağlı olarak yapılan gen ifade analizlerine göre;

KMS20 hücre hattında 24 saat içerisinde P-gp (~ 45 kat), MRP-7 (~3 kat) ve GSTP1 (~2,3 kat) genlerinin ifadeleri artarken MRP-6 geni ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.40.). MRP-1 ve MRP-2 ifadesinde 24 saat içerisinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. KMS20 hücre hattında 48 saat içerisinde bortezomib dozunun artışına bağlı olarak P-gp (~9 kat) geni ifadesi artarken MRP-2, MRP-6 ve MRP-7 genlerinin ifadeleri azalmaktadır. MRP-1 ve GSTP1 ifadesinde ise herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Hem 24 hem de 48 saatte MRP-3 geni ifadesi tespit edilmemiştir. Sonuç olarak, KMS20 hücre hattının bortezomibe karşı oluşan dirençliliğinden asıl sorumlu genin P-gp olduğu, dirençliliğe sebep olan diğer genlerin ise MRP-7 ve GSTP1 olduğu tespit edilmiştir. MRP-7 geninin multiple myelomada bortezomib dirençliliğiyle ilişkili olduğu ilk kez bu çalışmayla ortaya konmuştur.

Şekil 4.40.'da görüldüğü gibi KMS28 hücre hattında 24 saat içerisinde bortezomib dozunun artışına bağlı olarak GSTP1 ve MRP-7 genlerinin ifadeleri artarken MRP-2 ve MRP-6 genlerinin ifadelerinin azaldığı bulunmuştur. Fakat MRP-7 artışının IC₅₀ değeri üzerindeki sadece 7,5 nM'da görülmesi bu hücre hattının bortezomib dirençliliğinde rol oynadığını göstermez, çünkü diğer dozlarda ifade artışı anlamlı değildir. KMS28 hücre hattında 24 saat içerisinde P-gp ve MRP-3 genlerinin ifadeleri tespit edilmemiş ayrıca MRP-1 ifadesinde de herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. KMS28 hücre hattında 48 saat içerisinde bortezomib dozunun artışına bağlı olarak GSTP1 ve MRP-2 genlerinin ifadeleri artarken MRP-1 ve MRP-6 genlerinin ifadeleri azalmaktadır. Fakat MRP-2 artışının IC₅₀ değeri üzerindeki sadece 5 nM'da görülmesi bu hücre hattının bortezomib dirençliliğinde rol oynadığını göstermez, çünkü diğer dozlarda ifade artışı anlamlı değildir. KMS28 hücre hattında 48 saat içerisinde P-gp ve MRP-3 genlerinin ifadeleri tespit edilmemiş

ayrıca MRP-7 ifadesinde de herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Sonuç olarak, hem 24 hem de 48 saat sürelerde bortezomib dozunun artışına bağlı olarak sadece GSTP1 geninin yüksek ifadesi ve P-gp geninin hiç ifade edilmemesi KMS28 hücre hattının bortezomibe hassas olmasını sağlayan faktörlerdendir.

Tez çalışmasında, sabit bortezomib dozlarına uzun süre maruz bırakılarak yapılan gen ifade analizleri Şekil 4.41.'de görüldüğü gibi; KMS20 hücre hattında P-gp geni ifadesi hem 24 hem de 48 saat içerisinde artmaktadır. Fakat dikkat edilmesi gereken nokta, bu artışın 48 saatte 24 saate göre neredeyse yarıya düşmüş olmasıdır. Bu durum P-gp'nin ilk 24 saatte hızlı ve net bir şekilde ifade edildiğini düşündürmektedir. MRP-1 geni ifadesi hem 24 hem de 48 saat içerisinde artmakta ve bu artış 48 saat içerisinde daha fazla olmaktadır. Bu durum MRP-1'in dirençli hücre hattının uzun süre yüksek dozda bortezomibe maruz kalmasına bağlanabilir. 24 saat içerisinde MRP-2, MRP-7 ve GSTP1 genlerinin ifadeleri artmaktadır. Hatta MRP-2 geni ifadesi 48 saatte azalarak çok ilginç bir durum ortaya çıkarmıştır. Bu durum bu genlerin ifadelerinin dirençli hücre hattında 24 saatte gerçekleştiğini düşündürmektedir. MRP-6 geni ifadesi zamanla azalmakta hatta yüksek dozda hiç tespit edilmemektedir. MRP-3 geni ise hiç ifade edilmemiştir. Sonuç olarak dirençli hücre hattında bortezomib en fazla oranda P-gp ile taşınır fakat bu genin ifadesinin bir sınırı vardır. Bu yüzden bortezomib büyük olasılıkla GSTP1 ile glutatyonlanarak MRP taşıyıcılarına sunulur. MRP-7 dirençli hücre hattında bortezomibin atılmasında ikincil taşıyıcı olarak görev alır. Ancak dirençli MM hücreleri uzun süre yüksek dozda bortezomibe maruz kaldığında devreye MRP-1 girerek bortezomibin dışarı atılmasını sağlayacaktır. MRP-2 de diğer MRP taşıyıcılarına yardımcı olsa da bu ifade artışı kalıcı değildir.

Şekil 4.41.'de görüldüğü gibi KMS28 hücre hattında GSTP1 geni ifadesi hem 24 hem de 48 saat içerisinde neredeyse aynı seviyede artmaktadır. Bu durum hassas hücre hattında P-gp geni ifadesi olmadığı için, bortezomibin dışarı atılmak üzere GSTP1 ile glutatyonlanarak MRP taşıyıcılarına sunulduğu görüşünü desteklemektedir. MRP-1, MRP-2 ve MRP-7 genlerinin ifadeleri 24 saatte neredeyse aynı seviyede artmaktayken, 48 saat içerisinde sadece MRP-2 geni ifadesinde bu artış devam etmemiştir. Bunun nedeni hassas hücre hattına uzun süre çok yüksek bortezomib dozları uygulanmasından dolayı neredeyse dirençli hücre hattına benzer

bir MRP profili ortaya çıkarmasıdır. MRP-6 geni ifadesinin sadece 24 saat içerisinde azaldığı gözlenmiş 48 saat içerisinde ise tespit edilmemiştir. MRP-3 geni ise hiç ifade edilmemiştir. Sonuç olarak hassas hücre hattında P-gp geni ifadesi olmadığı için GSTP1, bortezomibin glutatyonlanarak atılmasında görev alır. Bu hücre hattı uzun süre yüksek dozda bortezomibe maruz kaldığında MRP-1 ve MRP-7 taşıyıcıları bortezomibin dışarı atılmasında görev alacaktır. MRP-2'nin de kısmen bu göreve katıldığı düşünülmektedir.

Şekil 4.40. ve 4.41. birlikte incelendiğinde tüm çalışmada MRP-6 geni ifadesinin her iki hücre hattında da azaldığı tespit edilmiştir. Buna göre bu taşıyıcının bortezomibi taşımadığı hatta bortezomib tarafından inhibe edildiği düşünülmektedir. MRP-6 geninin multiple myelomada bortezomib dirençliliğiyle ilişkisinin olmadığı ilk kez bu çalışmayla ortaya çıkmıştır.

Yapılan birçok araştırmada, kanser hastalarına uygulanan kemoterapinin başarısız olmasının temel nedeninin P-gp aracılığıyla gelişen dirençlilik olduğu rapor edilmiştir (Linsenmeyer vd., 1992; Kool vd., 1997; Schwarzenbach, 2002; Donnenberg ve Donnenberg, 2005; Keshet vd., 2008; Lee, 2010). P-gp'nin normal dokulardaki görevi hücreleri ksenobiyotiklerin toksik etkisinden korumaktır (Yeh vd., 1992). P-gp kanser hücrelerinde ise normalden fazla ifade edilerek, yapısal olarak farklı pek çok ilacın hücre içerisine alınmasını engellemek ve bunları tümör hücrelerinden dışarı atmak suretiyle intraselüler ilaç konsantrasyonlarının azalmasına neden olmaktadır (Vaalburg vd., 2005; Stavrovskaya ve Stromskaya, 2008; Yuan vd., 2008; Lee, 2010). Yapılan çalışmaların bir kısmı P-gp'nin BTZ dirençliliğinde rol oynadığını iddia ederken (Grogan vd., 1993; Wyler vd., 1997; Lacave vd., 1998; Rumpold vd., 2007; Nakamura vd., 2007; Iijima vd., 2010; O'Connor vd., 2013; Zhou vd., 2013), diğerleri BTZ'in P-gp için zayıf bir substrat olduğunu belirtmiştir (Minderman vd., 2007; Oerlemans vd., 2008; Wiberg vd., 2009; Verbrugge vd., 2012; Lü ve Wang, 2013; Soriano vd., 2016). Yapılan çalışmanın sonuçlarında P-gp geni ifadesinde artışın gözlenmesi, bortezomibin bu taşıyıcıyla taşındığını ve dirençlilikten esas sorumlu genin P-gp olduğunu açık bir şekilde ortaya koymaktadır. Fakat bortezomibin P-gp'ye bağlı dirençliliğinin sınırlı olduğu da rapor edilmiştir (Rumpold vd., 2007). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde P-gp genini aşırı yüksek ifade eden KMS20 hücre hattından bortezomib hızla uzaklaştırılarak, dirençli hale

gelmesinde en etken taşıyıcı olduğu fakat bu ifadenin belli bir sınırdan öte geçemediği gösterilmiştir. Bu yüzden sadece bu genin ifadesinin engellenmesi dirençlilik gelişiminin önüne geçemeyecektir. KMS28 hücre hattında ise P-gp ifadesinin hiç gözlenmemesi, onu bortezomibe hassas yapan etken olup yapılan diğer bir çalışmada bunu desteklemektedir (Lee vd., 2012).

Tümör hücrelerinde GSH'nın yüksek düzeylere ulaşması ve GST'nin aşırı ifadesi direnç gelişimi ile paraleldir (Townsend ve Tew, 2003; Franco ve Cidlowski, 2009). Artmış GSH/GST seviyelerinin kemoterapi tedavisinde bu sistemle metabolize olan pek çok ilacın metabolizmasını hızlandırarak, ilaçla hedeflenen etkiye ulaşamamasına ve direnç gelişimine sebep olduğu gösterilmiştir (O'Brien ve Tew, 1996; Tew vd., 1997). Birçok çalışmada dirençli kanser hücre hatlarında artmış GSH seviyeleri ve GSTP1 ifadesi bulunmuştur (Zaman vd., 1995; Ishikawa vd., 1996; Kool vd., 1997; Lacave vd., 1998; Advani vd., 2010; Masood vd., 2011). Yakın zamanda MM hücre hatlarının bortezomib sitotoksitesinde de GSH'nın temel belirleyici olduğu rapor edilmiştir (Stella vd., 2013; Starheim vd., 2016). Bu durumda bortezomib hücreden glutatyonlanarak detoksifiye edilebilir ve MRP taşıyıcıları glutatyonlanmış bortezomibin hücreden atılmasına aracılık eder (Zaman vd., 1995; Keppler ve König, 1997; Keppler vd., 1998; Cole ve Deeley, 1998; Rea vd., 1998; Cui vd., 1999). Çalışmamızın sonuçlarında her iki hücre hattında da GSTP1 ifadesinin artması bortezomibin yüksek ihtimalle glutatyonlanarak hücreden uzaklaştırıldığını düşündürmektedir. Bortezomib, UPS'i kesintiye uğratar ve bu da proteinlerin birikimi, proapoptotik faktörler ve reaktif oksijen bileşiklerini (ROS) içeren apoptozisin tetiklenmesini sağlar (Lipchick vd., 2016; Naymagon ve Abdul-Hay, 2016). GSTP1 ifadesi yalnızca detoksifikasyon kapasitesiyle değil, aynı zamanda apoptozisin engellenmesini içeren sinyal yollarıyla da MDR ile ilişkilidir (Di Simone vd., 1997; Wang vd., 2001; Chauhan vd., 2004; Laborde, 2010).

MRP-7 geni ifadesi çeşitli kanser hücre hatlarında tespit edilmiş (Hopper-Borge vd., 2004, 2009; Naramoto vd., 2007; Oguri vd., 2008; Bessho vd., 2009; Hu vd., 2011; De Souza vd., 2011; Borel vd., 2012; Hlavata vd., 2012; Anreddy vd., 2014), fakat şu ana kadar yapılan çalışmalarda MM hücre hatlarında hiç çalışılmamıştır. Multiple myelomada MRP-7 geni ifadesinin bortezomib dirençliliğiyle ilişkili olduğu ilk defa yaptığımız çalışmayla ortaya çıkmıştır. MRP-7, 6. kromozomu glutatyon metabolizmasındaki genlerle paylaşmakta ve Glutatyon S-konjugatları ile ilgili

ilaçlara karşı birlikte direnç oluşturmaktadır (Chen vd., 2003; Hopper-Borge vd., 2004; Avcu, 2009). Çalışmamızın sonuçları, MRP-7 ifadesinin artışı bortezomibin hücreden atılmasına katkı sağladığını ve MM hücrelerinin dirençli hale gelmesinde önemli rolü olduğunu göstermektedir. Başka bir çalışmada MRP-7 geni ifadesinin sadece taşıyıcı rolüyle değil, aynı zamanda hücre döngüsü kontrolündeki sinyal yollarıyla da MDR ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Xie vd., 2017).

MRP-1 yapısal olarak farklı çeşitteki substratları taşıyabilir (Jedlitschky vd., 1994, 1996; Leier vd., 1994; Muller vd., 1994) ve ilaçları taşıma yeteneği de önemlidir (Ishikawa, 1992; Hipfner vd., 1999; Konig vd., 1999a; Leslie vd., 2005; Cole ve Deeley, 2006). Yapılan çalışmalarda dirençli kanser hücre hatları ve MM hastalarında MRP-1 ifadesinin tespit edilmesi bu çalışmayla aynı doğrultudayken (Zaman vd., 1993; Krishnamachary ve Center, 1993; Abbaszadegan vd., 1994; Kool vd., 1997; Wyler vd., 1997; Schwarzenbach, 2002; Zhou vd., 2013), başka bir çalışmada ise MM’de MRP-1 ifadesine çok az rastlanıldığı rapor edilmiştir (O’Connor vd., 2013). Bunun sebebi çalışmamızda ortaya çıkan MRP-1 ifadesinin, bortezomibin yüksek dozlarına uzun süre maruz kalma sonucunda açığa çıkması olabilir. MRP-1 geni ifadesinin yüksek ilaç konsantrasyonlarında başlangıçta düşük seviyede direnç sunabilirken, P-gp’nin yüksek ifadesinin sonrasında artabileceği daha önce rapor edilmiştir (Reeve vd., 1989; Lautier vd., 1996). Bizim çalışmamızda da P-gp geninin önce yüksek ifadesi, bortezomibe uzun süre maruziyet sonrasında ise bu ifadenin sınırlandığı ve devreye MRP-1’in girdiği gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar MRP-1 ifadesinin yalnızca taşıma kapasitesiyle değil aynı zamanda çeşitli sinyal yolları üzerinden apoptozisi engellemesiyle de MDR ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Wyler vd., 1997; Lee vd., 2004).

Çalışmamızda ortaya çıkan GSTP1, MRP-1 ve MRP-7 genlerinin ifadeleri birlikte değerlendirildiğinde, bunların ilaç dirençliliğinin gelişiminde hücre döngüsü ve apoptozis mekanizmalarıyla da birlikte çalıştıkları fikrini düşündürmektedir. Bortezomibin DNA-protein kinaz katalitik subünitesi parçalanmasını ve ATM proteinini indükleyerek aynı zamanda DNA tamirini engellediğini rapor eden çalışmalar da bu fikri desteklemektedir (Hideshima vd., 2003). Bu durum da yaptığımız başka bir çalışmada bortezomible muamele edilen KMS20 hücre hattında Bcl-2/Bax oranının artması ve Kaspaz-3 ifadesinin azalması sonucu apoptozisin

engellenmesinin, bortezomib dirençliliğine neden olan faktörlerden biri olmasıyla açıklanmaktadır (Öksüzoğlu ve Kozalak, 2018).

Yapılan çalışmaların çoğunda MRP-2 geninin ifadesi dirençli kanser hücre hatlarında tespit edilmiş ve polimorfizmleri MM'le ilişkilendirilmiştir (Ishikawa vd., 1996; Taniguchi vd., 1996; Kool vd., 1997; Kuo vd., 1998; Nies vd., 2001; Korita vd., 2010; Ebert vd., 2011; Macaudo vd., 2018). Bizim çalışmamızda ise MRP-2 geni ifadesi bortezomib dirençliliğine sadece kısmen etki göstermiş ve bazen de gen ifadesi azalmıştır. Bu durum MRP-2'nin taşıma kinetiğinin allosterik olmasıyla açıklanabilir (Zelcer vd., 2003; Bandler vd., 2008). Çalışmamızın sonuçlarına göre bortezomib MRP-2 ile taşınabilmekte, fakat yüksek ilgiye sahip substratların çoğu aynı zamanda rekabetçi inhibitör örnekleri olabileceğinden (Loe vd., 1996a,b; Keppler vd., 1998) uzun süre yüksek dozda uygulanan bortezomib MRP-2 ifadesini engelleyebilir. Çalışmamızın sonuçlarına dayanarak MRP-2'nin MM'de hücre döngüsü ve apoptozis gibi diğer ilaç dirençlilik mekanizmalarıyla ilişkisi üzerine yapılacak daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu önerilmektedir.

Şu ana kadar yapılan çalışmalarda MRP-6 geninin, dirençli kanser hücre hatlarında ancak MRP-1 ile birlikte ifade olduğu rapor edilmiştir (Zaman vd., 1993; Kool vd., 1999a). Yaptığımız çalışmada, MRP-6 geninin multiple myelomada bortezomib dirençliliğiyle ilişkisinin olmadığı ilk kez ortaya çıkmıştır. Çalışmamızın sonuçları, hücre hatlarıyla yapılan bütün deneylerde MRP-6 ifadesinin azaldığını, hatta bazen tespit edilemediğini göstermektedir. Bu durum bortezomibin MRP-6 ifadesini inhibe ettiğini düşündürmektedir. Bu inhibisyon mekanizmasının daha ayrıntılı araştırılması faydalı olacaktır. Ayrıca daha önce yapılan araştırmaların tersine, çalışmamızda MRP-1 geni ifadesi yüksek iken MRP-6 ifadesi ise azalmaktadır. Bu durum MRP-6 ifadesinin her zaman MRP-1 ile birlikte olmadığını açık bir şekilde ortaya koymaktadır.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda MRP-3 geni ifadesi dirençli kanser hücre hatlarında MRP-2 ile birlikte bulunmuş hatta MM kök hücrelerindeki ilaç dirençliliğinde ve klonal yayılımdaki sinyal yolları üzerinde etkili olduğu rapor edilmiştir (Kool vd., 1997; Nies vd., 2001; Peacock vd., 2007; Matsui vd., 2008; Zhao vd., 2013; Yang vd., 2013). Fakat bizim çalışmamızda diğer çalışmaların tersine, hücre hatlarıyla yapılan tüm deneylerde MRP-3 ifadesi hiç tespit

edilmemiştir. Çalışmamızın sonuçları, bortezomibin büyük olasılıkla glutatyonlanarak atıldığını göstermektedir. Bu durum MRP-3'ün ilaç taşıma mekanizmasında glutatyonun aracılık etmemesinden (Hirohashi vd., 1999; Kool vd., 1999b) kaynaklanıyor olabilir. MM'de bortezomib dirençliliğinde MRP-3 ifadesiyle ilgili yapılacak daha fazla çalışma çelişkinin giderilmesini sağlayacaktır.

MM hücrelerinde çalışmamızın dışında, dirençlilikle bağlantılı başka mekanizmalar üzerinde de çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. MM'de yapılan son çalışmalar, bortezomib dirençliliğinin IRE1/XBP1 azaltılmış etkinliği ve UPR'ın aktivite durumundaki değişiklikler sonucu olduğunu göstermiştir (Chapman vd., 2011; Leung-Hagesteijn vd., 2013; Soriano vd., 2016). MM hücrelerinin canlılığının, yanlış katlanmış proteinlerin ve fonksiyonel olmayan yeni sentezlenmiş proteinlerin proteozom aracılığıyla degradasyonuna dayandığı zaten bilinmektedir (Mayor, 2011). Proteozomun inhibisyonu; hasarlı proteinlerin toksik birikimine yol açarak ER stresini uyandırır ve UPR cevabını aktifler (Schubert vd., 2000; Yewdell ve Nicchitta, 2006; van Deventer ve Neefjes, 2010). Bu aktivasyon, otofaji ve ubiquitin proteozom sisteminin düzenlenmesinin artışı sağlar. UPS ve otofaji bağımsız fonksiyonlar olarak düşünülse de artık bu iki proteolitik yolun işbirliği yaptığı kabul edilmiştir. Otofaji hücre içi proteinlerin degradasyonu ve dönüşümü için alternatif bir yol oluşturarak, normal hücrelerde tümör baskılayıcı gibi rol oynarken, stres koşullarında tümör hücre yaşamını indükleyebilir (White ve Di Paola, 2009; Lilienbaum, 2013). Proteozom inhibisyonu üzerine otofaji, UPS substratlarını elimine etmek için hayatta kalma mekanizması başlatacaktır (Ding vd., 2007; Milani vd., 2009; Zhu vd., 2010; Zang vd., 2012). Bundan dolayı, otofajinin uyarılması bortezomib dirençliliğinde rol oynayabilir (Amaravadi vd., 2011). Bu nedenle MM hücrelerinde otofojiyle ilgili daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında MM hücre hatlarında ilaç dirençliliğinin nedenlerinden biri olan MDR taşıyıcılarının gen ifade düzeyleri incelenmiş ve bortezomib dirençliliği gelişiminde P-gp'nin birincil taşıyıcı olduğu belirlenmiştir. Bortezomibin büyük olasılıkla GSTP1 ile glutatyonlanarak MRP taşıyıcılarıyla hücreden atıldığı düşünülmektedir. MRP-7'nin bortezomib dirençliliğinden sorumlu olduğu ilk kez bu çalışmayla gösterilmiştir. Ayrıca uzun süre yüksek bortezomib dozuna maruz bırakılmayla MRP-1 ifadesinin ortaya çıktığı ve bu durumdaki MRP-2'nin

bortezomib dirençliliği gelişiminde kısmen etkili olduğu da tespit edilmiştir. MRP-6 ifadesinin bortezomib dirençliliğiyle ilişkisinin olmadığı ilk kez bu çalışmayla gösterilmiştir. MRP-3 ifadesi, kullanılan her iki hücre hattında da tespit edilmemiştir. Elde edilen bulgular, multiple myeloma hastalığını moleküler düzeyde daha iyi anlamamızı ve bortezomib direncini önleyebilmek için yeni yöntemler geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. Bu sonuçlar doğrultusunda yüksek ifade edilen genler siRNA veya uygun moleküller kullanılarak baskılanabilir, bu sayede dirençlilik önlenabilir. Böylece hücreler ilaca hassaslaştırılarak, MM tedavisi daha etkin hale getirilebilir. Aynı zamanda MM hastalığında diğer tüm dirençlilik mekanizmalarının aydınlatılması sayesinde tedavi şekillerinin kişiye özel olarak geliştirilebilmesi de mümkün olabilecektir.



6. KAYNAKLAR

- Abbaszadegan, M. R., Futscher, B. W., Klimecki, W. T., List, A., Dalton, W. S., 1994. Analysis of Multidrug Resistance-associated Protein (MRP) Messenger RNA in Normal and Malignant Hematopoietic Cells, *Cancer research*, 4676-4679.
- Abdi, J., Chen, G., Chang, H., 2013. Drug resistance in multiple myeloma: latest findings and new concepts on molecular mechanisms, *Oncotarget*, 2186-207.
- Abe, T., Koike, K., Ohga, T., Kubo, T., Wada, M., Kohno, K., vd., 1995. Chemosensitization of spontaneous multidrug resistance by a 1,4-dihydropyridine analog and verapamil in human glioma cell lines overexpressing MRP or MDR1, *Br J Cancer*, 418-423.
- Adams, J., 2003. Potential for proteasome inhibition in the treatment of cancer, *Drug Discov Today*, 307-15.
- Adams, J., 2004a. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs, *Cancer Cell*, 417-421.
- Adams, J., 2004b. The proteasome: a suitable antineoplastic target, *Nat Rev Cancer*, 349-360.
- Adams, J., Kauffman, M., 2004. Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib), *Cancer Invest*, 304-311.
- Adams, J., Behnke, M., Chen, S., Cruickshank, A., Dick, L., Grenier, L., vd., 1998. Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids, *Bioorg Med Chem Lett*, 333-338.
- Adams, J., Palombella, V., Sausville, E., Johnson, J., Destree, A., Lazarus, D., vd., 1999. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents, *Cancer Res*, 2615-2622.
- Advani, A. S., Shadman, M., Ali-Osman, F., Barker, A., Rybicki, L., Kalaycio, M., vd., 2010. A Phase II Trial of Gemcitabine and Mitoxantrone for Patients With Acute Myeloid Leukemia in First Relapse, *Clinical Lymphoma, Myeloma Leukemia*, 473-476.
- Agarwal, A., Xing, C., DeMartino, G., Mizrachi, D., Hernandez, M., Sousa, A., vd., 2010. PSMB8 encoding the B5i proteasome subunit is mutated in joint contractures, muscle atrophy, microcytic anemia, and panniculitis-induced lipodystrophy syndrome, *Am J Hum Genet*, 866-872.
- Aghajanian, C., Soignet, S., Dizon, D., Pien, C., Adams, J., Elliott, P., vd., 2002. A phase I trial of the novel proteasome inhibitor PS341 in advanced solid tumor malignancies, *Clin Cancer Res*, 2505-2511.
- Aksoy, Y., 2002. The role of Glutathione in antioxidant mechanism, *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 442-8.

- Altun, M., Galardy, P., Shringarpure, R., Hideshima, T., LeBlanc, R., Anderson, K., vd., 2005. Effects of PS-341 on the activity and composition of proteasomes in multiple myeloma cells *Cancer Res*, 7896–7901.
- Amaravadi, R., Lippincott-Schwartz, J., Yin, X., Weiss, W., Takebe, N., Timmer, W., vd., 2011. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment, *Clin Cancer Res*, 654–666.
- Ambudkar, S., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z., Gottesman, M., 2003. P-glycoprotein: from genomics to mechanism, *Oncogene*, 7468–7485.
- An, W., Hwang, S., Trepel, J., Blagosklonny, M., 2000. Protease inhibitor-induced apoptosis: Accumulation of wt p53, p21WAF1/CIP1, and induction of apoptosis are independent markers of proteasome inhibition, *Leukemia*, 1276–83.
- Anderson, K., Carrasco, R., 2011. Pathogenesis of myeloma, *Annu Rev Pathol*, 249–274.
- Annunziata, C., Davis, R., Demchenko, Y., Bellamy, W., Gabrea, A., Zhan, F., vd., 2007. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma, *Cancer Cell*, 115–30.
- Anreddy, N., Patel, A., Sodani, K., Kathawala, R. J., Chen, E. P., Wurpel, J. N., vd., 2014. PD173074, a selective FGFR inhibitor, reverses MRP-7 (ABCC10)-mediated MDR, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 202–207.
- Arastu-Kapur, S., Anderl, J., Kraus, M., Parlati, F., Shenk, K., Lee, S., vd., 2011. Nonproteasomal targets of the proteasome inhibitors bortezomib and carfilzomib: a link to clinical adverse events, *Clin Cancer Res*, 2734–2743.
- Arendt, C., Hochstrasser, M., 1997. Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active site formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 7156–7161.
- Arima, K., Kinoshita, A., Mishima, H., Kanazawa, N., Kaneko, T., Mizushima, T., vd., 2011. Proteasome assembly defect due to a proteasome subunit beta type 8 (PSMB8) mutation causes the autoinflammatory disorder, Nakajo-Nishimura syndrome, *Proc Natl Acad Sci USA*, 14914–14919.
- Armstrong, R., 1987. Enzyme-catalyzed detoxification reactions, mechanisms and stereochemistry, *CRC Crit Rev Biochem*, 39–88.
- Armstrong, R., 1991. Glutathione S-transferase: reaction mechanism, structure and function, *Chem Res*, 131–140.
- Armstrong, R., 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases, *Chem Res Toxicol*, 2–18.
- Arrick, B., Nathan, C., 1984. Glutathion metabolism as a determinant of the therapeutic efficacy, *Cancer Res*, 4224–32.

- Augustine, L., Markelewicz, R. B., Cherrington, N., 2005. Xenobiotic and endobiotic transporter mRNA expression in the blood-testis barrier, *Drug Metab Dispos*, 182–9.
- Avcu, F., 2009. Hematolojik Malignitelerde İlaç Direnç Mekanizmaları, *Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi, Temel Moleküler Hematoloji Kursu*, 61-64.
- Avet-Loiseau, H., 2007a. Role of genetics in prognostication in myeloma, *Best Pract Res Clin Haematol*, 625–35.
- Avet-Loiseau, H., Attal, M., Moreau, P., Charbonnel, C., Garban, F., Hulin, C., vd., 2007b. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome, *Blood*, 3489-3495.
- Avet-Loiseau, H., Leleu, X., Roussel, M., Moreau, P., Guerin-Charbonnel, C., Caillot, D., vd., 2010. Bortezomib plus dexamethasone induction improves outcome of patients with t(4;14) myeloma but not outcome of patients with del(17p), *J Clin Oncol*, 4630-4634.
- Baguley, B. C., 2010. Multidrug resistance in cancer, *Methods Mol Biol*, 1-14.
- Bakos, E., Evers, R., Szakacs, G., Tusnady, G., Welker, E., Szabo, K. vd., 1998. Functional multidrug resistance protein (MRP) lacking the N-terminal transmembrane domain, *J Biol Chem*, 32167–75.
- Ballatori, N., Krance, S., Marchan, R., Hammond, C., 2009. Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology, *Mol Aspects Med*, 13–28.
- Balsas, P., Galan-Malo, P., Marzo, I., Naval, J., 2012. Bortezomib resistance in amyeloma cell line is associated to PSMB5 overexpression and polyploidy, *Leuk Res*, 212–218.
- Bandler, P., Westlake, C., Grant, C., Cole, S., Deeley, R., 2008. Identification of regions required for apical membrane localization of human multidrug resistance protein 2, *Mol Pharmacol*, 9–19.
- Barlogie, B., Jagannath, S., Desikan, K., Mattox, S., Vesole, D., Siegel, D., vd., 1999. Total therapy with tandem transplants for newly diagnosed multiple myeloma, *Blood*, 55–65.
- Barrand, M., Rhodes, T., Center, M., Twentyman, P., 1993. Chemosensitisation and drug accumulation effects of cyclosporin A, PSC-833 and verapamil in human MDR large cell lung cancer cells expressing a 190k membrane protein distinct from P-glycoprotein, *Eur J Cancer*, 408-415.
- Basler, M., Dajee, M., Moll, C., Groettrup, M., Kirk, C., 2010. Prevention of experimental colitis by a selective inhibitor of the immunoproteasome, *J Immunol*, 634–641.

- Batist, G., Behrens, B., Makuch, R., Hamilton, T., Katki, A., Louie, K. vd., 1986. Serial determinations of glutathione levels and glutathione-related enzyme activities in human tumor cells in vitro, *Biochem Pharmacol*, 2257-2259.
- Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F., Seemüller, E., 1998. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease, *Cell*, 367–380.
- Belinsky, M., Kruh, G., 1999. MOAT-E (ARA) is a full-length MRP/cMOAT subfamily transporter expressed in kidney and liver, *Br J Cancer*, 1342–9.
- Belinsky, M., Bain, L., Balsara, B., Testa, J., Kruh, G., 1998. Characterization of MOAT-C and MOAT-D, new members of the MRP/cMOAT subfamily of transporter proteins, *J Natl Cancer Inst*, 1735–41.
- Belinsky, M., Chen, Z., Shchaveleva, I., Zeng, H., Kruh, G., 2002. Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance protein 6 (MRP-6, ABCC6), *Cancer Res*, 6172–6177.
- Belinsky, M., Dawson, P., Shchaveleva, I., Bain, L., Wang, R., Ling, V., vd., 2005. Analysis of the in vivo functions of MRP-3, *Mol Pharmacol*, 160–8.
- Benderra, Z., Faussat, A., Sayada, L., Perrot, J., Tang, R., Chaoui, D., vd., 2005. MRP-3, BCRP, and P-glycoprotein activities are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia, *Clin Cancer Res*, 7764–72.
- Benet, L., Cummins, C., Wu, C., 2004. Unmasking the dynamic interplay between efflux transporters and metabolic enzymes, *Int J Pharm*, 3-9.
- Bera, T., Iavarone, C., Kumar, V., Lee, S., Lee, B., Pastan, I., 2002. MRP-9, an unusual truncated member of the ABC transporter superfamily, is highly expressed in breast cancer, *Proc Natl Acad Sci USA*, 6997–7002.
- Bera, T., Lee, S., Salvatore, G., Lee, B., Pastan, I., 2001. MRP-8, a new member of ABC transporter superfamily, identified by EST database mining and gene prediction program, is highly expressed in breast cancer, *Mol Med*, 509–516.
- Bergsagel, P., Kuehl, W., 2001. Chromosome translocations in multiple myeloma, *Oncogene*, 5611–5622.
- Bergsagel, P., Kuehl, W., 2005. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma, *J Clin Oncol*, 6333–6338.
- Berkers, C., Verdoes, M., Lichtman, E., Fiebigier, E., Kessler, B., Anderson, K., vd., 2005. Activity probe for in vivo profiling of the specificity of proteasome inhibitor bortezomib, *Nat Methods*, 357–362.
- Bessho, Y., Oguri, T., Ozasa, H., Uemura, T., Sakamoto, H., Miyazaki, M., vd., 2009. ABCC10/MRP-7 is associated with vinorelbine resistance in non-small cell lung cancer, *Oncol Rep*, 263–8.

- Bianchi, G., Oliva, L., Cascio, P., Pengo, N., Fontana, F., Cerruti, F., vd., 2009. The proteasome load versus capacity balance determines apoptotic sensitivity of multiple myeloma cells to proteasome inhibition, *Blood*, 3040–3049.
- Biran, N., Jagannath, S., Chari, A., 2013. Risk stratification in multiple myeloma, part 2: The significance of genetic risk factors in the era of currently available therapies, *Clin Adv Hematol Oncol*, 578–583.
- Blade, J., Teresa-Ciberia, M., Rosinol, L., 2005, Bortezomib: A valuable new antineoplastic strategy in multiple myeloma. *Acta Oncologica*, 440- 448.
- Board, P. G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Easteal, S., Jermini, L. S., Schulte, C. vd., 2000. Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases, *J Biol Chem*, 24798-24806.
- Board, P., Baker, R., Chelvanayagam, G., Jermini, L., 1997. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to human, *Biochem J*, 929-935.
- Boccadoro M., Morgan G., Cavenagh J., 2005. Preclinical evaluation of the proteasome inhibitor in cancer therapy, *Cancer Cell Int*, 1-9.
- Bohuslav, J., Chen, L., Kwon, H., Mu, Y., Greene, W., 2004. p53 induces NF-kappaB activation by an IkappaB kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1, *J Biol Chem*, 26115-25.
- Bonizzi, G., Karin, M., 2004. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity, *Trends Immunol*, 280-288.
- Boraldi, F., Quaglino, D., Croce, M., Garcia Fernandez, M., Tiozzo, R., Gheduzzi, D., vd., 2003. Multidrug resistance protein-6 (MRP-6) in human dermal fibroblasts. Comparison between cells from normal subjects and from Pseudoxanthoma elasticum patients, *Matrix Biol*, 491–500.
- Borel, F., Han, R., Visser, A., Petry, H., van Deventer, S., Jansen, P., vd., 2012. Adenosine triphosphate binding cassette transporter genes upregulation in untreated hepatocellular carcinomas mediated by cellular microRNAs, *Hepatology*, 821–32.
- Borrello, I., 2012. Can we change the disease biology of multiple myeloma?, *Leukemia Research*, 3–12.
- Borst, P., Schinkel, A., 1997. Genetic dissection of the function of mammalian P-glycoproteins, *Trends Genet*, 217–22.
- Borst, P., de Wolf, C., van de Wetering, K., 2007. Multidrug resistance associated proteins 3, 4, and 5, *Pflügers Arch*, 661–673.
- Borst, P., Evers, R., Kool, M., Wijnholds, J., 2000. A Family of Drug Transporters: the Multidrug Resistance-Associated Proteins, *Journal of the National Cancer Institute*, 1295-1302.

- Borst, P., Zelcer, N., van de Wetering, K., 2006. MRP-2 and 3 in health and disease, *Cancer Lett*, 51–61.
- Bortfeld, M., Rius, M., Konig, J., Herold Mende, C., Nies, A., Keppler, D., 2006. Human multidrug resistance protein 8 (MRP-8/ABCC11), an apical efflux pump for steroid sulfates, is an axonal protein of the CNS and peripheral nervous system, *Neuroscience*, 1247–1257.
- Boyd, K., Pawlyn, C., Morgan, G., Davies, F., 2012. Understanding the molecular biology of myeloma and its therapeutic implications, *Expert Rev Hematol*, 603–617.
- Brioli, A., Melchor, L., Cavo, M., Morgan, G., 2014. The impact of intra-clonal heterogeneity on the treatment of multiple myeloma, *Br J Haematol*, 441–454.
- Buac, D., Shen, M., Schmitt, S., Kona, F., Deshmukh, R., Zhang, Z., vd., 2013. From Bortezomib to other Inhibitors of the Proteasome and Beyond, *Curr Pharm Des*, 4025–4038.
- Burg, D., Mulder, G., 2002. Glutathione conjugates and their synthetic derivatives as inhibitors of glutathione-dependent enzymes involved in cancer and drug resistance, *Drug Met Rev*, 821–63.
- Busino, L., Bassermann, F., Maiolica, A., Lee, C., Nolan, P., Godinho, S., vd., 2007. SCFFbx13 controls the oscillation of the circadian clock by directing the degradation of cryptochrome proteins, *Science*, 900–4.
- Cahill, K. E., Morshed, R. A., & Yamini, B., 2016. Nuclear factor-kB in glioblastoma: insights into regulators and targeted therapy, *Neuro-Oncology*, 329–339.
- Cairo, M., Jordan, C., Maley, C., Chao, C., Melnick, A., Armstrong, S., vd., 2010. NCI first International Workshop on the biology, prevention, and treatment of relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: report from the committee on the biological considerations of hematological relapse following allogeneic stem, *Biol Blood Marrow Transplant*, 709–728.
- Calatozzolo, C., Gelati, M., Ciusani, E., Sciacca, F., Pollo, B., Cajola, L., vd., 2005. Expression of drug resistance proteins P-gp, MRP-1, MRP-3, MRP-5 and GST-pi in human glioma, *J Neurooncol*, 113–21.
- Campbell, K., Witty, J., Rocha, S., Perkins, N., 2006. Cisplatin mimics ARF tumor suppressor regulation of RelA (p65) nuclear factor-kappaB transactivation, *Cancer Res*, 929–35.
- Cayrol, C., Ducommun, B., 1998. Interaction with cyclin-dependent kinases and PCNA modulates proteasome-dependent degradation of p21, *Oncogene*, 2437–2444.
- Cenci, S., van Anken, E., Sitia, R., 2011. Proteostasis and plasma cell pathophysiology, *Curr Opin Cell Biol*, 216–222.

- Chadebech, P., Bricchese, L., Baldin, V., Vidal, S., Valette, A., 1999. Phosphorylation and proteasome-dependent degradation of Bcl-2 in mitotic-arrested cells after microtubule damage, *Biochem Biophys Res Commun*, 823–827.
- Chang, H., Qi, C., Yi, Q., Reece, D., Stewart, A., 2005b. p53 gene deletion detected by fluorescence in situ hybridization is an adverse prognostic factor for patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation, *Blood*, 358–360.
- Chang, H., Stewart, A., Qi, X., Li, Z., Yi, Q., Trudel, S., 2005a. Immunohistochemistry accurately predicts FGFR3 aberrant expression and t(4;14) in multiple myeloma, *Blood*, 353–5.
- Chapman, M., Lawrence, M., Keats, J., Cibulskis, K., Sougnez, C., Schinzel, A., vd., 2011. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma, *Nature*, 467–472.
- Chauhan, D., Catley, L., Li, G., Podar, K., Hideshima, T., Velankar, M., vd., 2005a. A novel orally active proteasome inhibitor induces apoptosis in multiple myeloma cells with mechanisms distinct from Bortezomib, *Cancer Cell*, 407–419.
- Chauhan, D., Hideshima, T., Anderson, K., 2005b. Proteasome inhibition in multiple myeloma: therapeutic implication, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 465–476.
- Chauhan, D., Kharbanda, S., Ogata, A., Urashima, M., Teoh, G., Robertson, M., vd., 1997b. Interleukin-6 inhibits Fas-induced apoptosis and stress-activated protein kinase activation in multiple myeloma cells, *Blood*, 227–234.
- Chauhan, D., Li, G., Podar, K., Hideshima, T., Mitsiades, C., Schlossman, R., vd., 2004. Targeting mitochondria to overcome conventional and bortezomib/proteasome inhibitor PS-341 resistance in multiple myeloma (MM) cells, *Blood*, 2458–2466.
- Chauhan, D., Pandey, P., Ogata, A., Teoh, G., Treon, S., Urashima, M., vd., 1997a. Dexamethasone induces apoptosis of multiple myeloma cells in a JNK/SAP kinase independent mechanism, *Oncogene*, 837–843.
- Chauhan, D., Singh, A., Aujay, M., Kirk, C., Bandi, M., Ciccarelli, B., vd., 2010. A novel orally active proteasome inhibitor ONX0912 triggers in vitro and in vivo cytotoxicity in multiple myeloma, *Blood*, 4906–4915.
- Chauhan, D., Tian, Z., Zhou, B., Kuhn, D., Orlowski, R., Raje, N., vd., 2011. In vitro and in vivo selective antitumor activity of a novel orally bioavailable proteasome inhibitor MLN9708 against multiple myeloma cells, *Clin Cancer Res*, 5311–5321.
- Chauhan, D., Uchiyama, H., Akbarali, Y., Urashima, M., Yamamoto, K., Libermann, T., vd., 1996. Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B, *Blood*, 1104–1112.

- Chen, C., Edelstein, L., Gelinas, C., 2000. The Rel/NF- κ B family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L), *Mol Cell Biol*, 2687–2695.
- Chen, D., Frezza, M., Schmitt, S., Kanwar, J., Dou, Q., 2011. Bortezomib as the First Proteasome Inhibitor Anticancer Drug: Current Status and Future Perspectives, *Curr Cancer Drug Targets*, 239–53.
- Chen, P., Hochstrasser, M., 1996. Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly, *Cell*, 961–972.
- Chen, X., Rotenberg, S., 2010. Phospho MARCKS drives motility of mouse melanoma cells, *Cell Signal*, 1097–1103.
- Chen, X., Wang, Q., Guan, J., Huang, Z., Zhang, W., Zhang, B., 2006. Reversing multidrug resistance by RNA interference through the suppression of MDR1 gene in human hepatoma cells, *World J Gastroenterol*, 3332–3337.
- Chen, Z. S., Tiwari, A. K., 2011. Multidrug Resistance Proteins (MRPs/ABCCs) in Cancer Chemotherapy and Genetic Diseases, *FEBS J*, 3226–3245.
- Chen, Z., Guo, Y., Belinsky, M., Kotova, E., Kruh, G., 2005. Transport of bile acids, sulphated steroids, estradiol 17 β d glucuronide, and leukotriene C4 by human multidrug resistance protein 8 (ABCC11), *Mol Pharmacol*, 545–557.
- Chen, Z., Hopper-Borge, E., Belinsky, M., Shchaveleva, I., Kotova, E., Kruh, G., 2003. Characterization of the transport properties of human multidrug resistance protein 7 (MRP-7, ABCC10), *Mol Pharmacol*, 351–8.
- Chesi, M., Nardini, E., Lim, R. vd., 1998. The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts, *Blood*, 3025–3034.
- Chng, W., Huang, G., Chung, T., Ng, S., Gonzalez-Paz, N., Troska-Price, T., vd., 2011. Clinical and biological implications of MYC activation: a common difference between MGUS and newly diagnosed multiple myeloma, *Leukemia*, 1026-1035.
- Cho, S., Lee, Y., Park, H., Ryoo, K., Kang, K., Park, J., vd., 2001. Glutathione S-transferase mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1, *J Biol Chem*, 12749-12755.
- Choi, C., 2005. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal, *Cancer Cell Int*, 30.
- Chondrogianni, N., Stratford, F., Trougakos, I., Friguet, B., Rivett, A., Gonos, E., 2003. Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts: induction of a senescence-like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation, *J Biol Chem*, 28026–28037.
- Chondrogianni, N., Tzavelas, C., Pemberton, A., Nezis, I., Rivett, A., Gonos, E., 2005. Overexpression of proteasome beta5 assembled subunit increases the

amount of proteasome and confers ameliorated response to oxidative stress and higher survival rates, *J Biol Chem*, 11840–11850.

- Chu, X., Kato, Y., Niinuma, K., Sudo, K., Hakusui, H., Sugiyama, Y., 1997. Multispecific organic anion transporter is responsible for the biliary excretion of the camptothecin derivative irinotecan and its metabolites in rats, *J Pharmacol Exp Ther*, 304–14.
- Chu, X., Strauss, J., Mariano, M., Li, J., Newton, D., Cai, X., vd., 2006. Characterization of mice lacking the multidrug resistance protein MRP-2 (ABCC2), *J Pharmacol Exp Ther*, 579–89.
- Ci, L., Kusuvara, H., Adachi, M., Schuetz, J., Takeuchi, K., Sugiyama, Y., 2007. Involvement of MRP4 (ABCC4) in the luminal efflux of ceftizoxime and cefazolin in the kidney, *Mol Pharmacol*, 1591–7.
- Ciechanover, A., 2006. The ubiquitin proteolytic system: from a vague idea, through basic mechanisms, and onto human diseases and drug targeting, *Neurology*, 7–19.
- Ciechanover, A., Schwartz, A., 1998. The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2727–30.
- Clurman, B., Sheaff, R., Thress, K., Groudine, M., Roberts, J., 1996. Turnover of cyclin E by the ubiquitin–proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation, *Genes Dev*, 1979–1990.
- Cole, S., 1992b. The 1991 Merck Frosst Award, Multidrug resistance in small cell lung cancer, *Can J Physiol Pharmacol*, 313–329.
- Cole, S., Deeley, R., 1998. Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP, *Bioessays*, 931–40.
- Cole, S., Deeley, R., 2006. Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP-1, *Trends Pharmacol Sci*, 438–446.
- Cole, S., Bhardwaj, G., Gerlach, J., Mackie, J., Grant, C., Almquist, K., vd., 1992a. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line, *Science*, 1650–4.
- Cole, S., Downes, H., Slovak, M., 1989. Effect of calcium antagonists on the chemosensitivity of two multidrug resistant human tumour cell lines which do not overexpress P-glycoprotein, *Br J Cancer*, 42–46.
- Cole, S., Sparks, K., Fraser, K., Loe, D., Grant, C., Wilson, G., vd., 1994. Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells, *Cancer Res*, 5902–5910.
- Combes, B., 1965. The importance of conjugation with glutathione for sulfobromophthalein sodium (BSP) transfer from blood to bile, *J Clin Invest*, 1214–1224.

- Compoti, M., 1987. Glutathione depleting agents and lipid peroxidation in the aging rat, *Com Biochem Phys*, 177-180.
- Cornelissen, J., Sonneveld, P., Schoester, M., Raaijmakers, H., Nieuwenhuis, H., Dekker, A., vd., 1994. MDR-1 expression and response to vincristine, doxorubicin, and dexamethasone chemotherapy in multiple myeloma refractory to alkylating agents, *J Clin Oncol*, 115-119.
- Coux, O., Tanaka, K., Goldberg, A., 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes, *Annu Rev Biochem*, 801-847.
- Cui, H., Shen, J., Lu, D., Zhang, T., Zhang, W., Sun, D. vd., 2008. 4-Aryl-1,3,2-oxathiazolylum-5-olate: a novel GST inhibitor to release JNK and activate c-Jun for cancer, *Cancer Chemother Pharmacol*, 509-15.
- Cui, Y., Konig, J., Buchholz, J., Spring, H., Leier, I., Keppler, D., 1999. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP-2, permanently expressed in human and canine cells, *Mol Pharmacol*, 929-937.
- Cusack, J. C., 2003. Rationale for the treatment of solid tumors with the proteasome inhibitor bortezomib, *Cancer Treatment Reviews*, 21-31.
- Cvek, B., Dvorak, Z., 2008. Can the old drug, disulfiram, have a bright new future as a novel proteasome inhibitor?, *Drug Discovery Today*, 716-722.
- Dalton, W., Crowley, J., Salmon, S., Grogan, T., Laufman, L., Weiss, G., vd., 1995. A phase III randomized study of oral verapamil as a chemosensitizer to reverse drug resistance in patients with refractory myeloma. A Southwest Oncology Group study, *Cancer*, 815-820.
- Dano, K., 1973. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells, *Biochim Biophys Acta*, 466-83.
- Dao, D., Sawyer, J., Esptein, J., vd., 1994. Deletion of retinoblastoma gene in multiple myeloma, *Leukemia*, 1280-1284.
- Dazert, P., Meissner, K., Vogelgesang, S., Heydrich, B., Eckel, L., Bohm, M., vd., 2003. Expression and localization of the multidrug resistance protein 5 (MRP-5/ABCC5), a cellular export pump for cyclic nucleotides, in human heart, *Am J Pathol*, 1567-77.
- De Souza, R., Zahedi, P., Badame, R., Allen, C., Piquette-Miller, M., 2011. Chemotherapy dosing schedule influences drug resistance development in ovarian cancer, *Mol Cancer Ther*, 1289-1299.
- De Wilt, L., Jansen, G., Assaraf, Y., Van Meerloo, J., Cloos, J., Schimmer, A., vd., 2012. Proteasome-based mechanisms of intrinsic and acquired bortezomib resistance in non-small cell lung cancer, *Biochem Pharmacol*, 207-217.
- Dean, M., Allikmets, R., 2001. Complete characterization of the human ABC gene family, *J Bioenerg Biomembr*, 475-479.

- Deeley, R., Cole, S., 2006. Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1), *FEBS Lett*, 1103–1111.
- Deeley, R., Westlake, C., Cole, S., 2006. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins, *Physiol Rev*, 849-99.
- Demant, E., Sehested, M., Jensen, P., 1990. A model for computer simulation of P-glycoprotein and transmembrane delta pH-mediated anthracycline transport in multidrug resistant tumor cells, *Biochim Biophys Acta*, 117–25.
- Demo, S., Kirk, C., Aujay, M., Buchholz, T., Dajee, M., Ho, M., vd., 2007. Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome. *Cancer Res*, 6383–6391.
- Di Martino, M., Arbitrio, M., Guzzi, P., Cannataro, M., Tagliaferri, P., Tassone, P., 2016. Experimental treatment of multiple myeloma in the era of precision medicine, *Expert Rev Precis Med Drug Dev*, 37–51.
- Di Simone, D., Galimberti, S., Mattii, L., Petrini, M., 1997. c-Jun and GST-p expression in human plasma cells, *Haematologica*, 69-70.
- Diehl, J., Zindy, F., Sherr, C., 1997. Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin–proteasome pathway, *Genes Dev*, 957–972.
- Ding, W., Ni, H., Gao, W., Chen, X., Kang, J., Stolz, D., vd., 2009. Oncogenic transformation confers a selective susceptibility to the combined suppression of the proteasome and autophagy, *Mol Cancer Ther*, 2036–2045.
- Ding, W., Ni, H., Gao, W., Yoshimori, T., Stolz, D., Ron, D., vd., 2007. Linking of autophagy to ubiquitin–proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability, *Am J Pathol*, 513–524.
- Doan, T., Melvold, R., Viselli, S., Waltenbaugh, C., 2013. Lippincott Görsel Anlatımlı Çalışma Kitapları İmmünoloji Çev: Deniz, G.; Erten, G.; Camcıoğlu, Y. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri Tic. Ltd. Şti.
- Dolcet, X., Llobet, D., Encinas, M., Pallares, J., Cabero, A., Schoenenberger, J., vd., 2006. Proteasome inhibitors induce death but activate NF-kappaB on endometrial carcinoma cell lines and primary culture explants, *J Biol Chem*, 22118-30.
- Donnenberg, V., Donnenberg, A., 2005. Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis, *J Clin Pharmacol*, 872–877.
- Donner, M., Keppler, D., 2001. Up regulation of basolateral multidrug resistance protein 3 (MRP-3) in cholestatic rat liver, *Hepatology*, 351–359.
- Dubin, I., Johnson, F., 1954. Chronic idiopathic jaundice with unidentified pigment in liver cells; a new clinicopathologic entity with a report of 12 cases, *Medicine (Baltimore)*, 155–97.

- Dunn, S. E., Hardman, R.A., Kari, F. W., Barret, J. C., 1997. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) alters drug sensitivity of HBL100 human breast cancer cells by inhibition of apoptosis induced by diverse anticancer drugs, *Cancer Res*, 2687-2693.
- Durie, B. G. M., Harousseau, J. L., Miguel, J. S., Blade, J., Barlogie, B., Anderson, K., vd., 2006. International uniform response criteria for multiple myeloma, *Leukemia*, 1467–1473.
- Durie, B. G. M., 2016. *Hasta El Kitab*, North Hollywood, California, International Myeloma Foundation.
- Ebert, B., Kisiela, M., Wsól, V., Maser, E., 2011. Proteasome inhibitors MG-132 and bortezomib induce AKR1C1, AKR1C3, AKR1B1, and AKR1B10 in human colon cancer cell lines SW-480 and HT-29, *Chem Biol Interact*, 239-49.
- Egan, P., Drain, S., Conway, C., Bjourson, A. J., Alexander, H. D., 2016. Towards Stratified Medicine in Plasma Cell Myeloma, *Int J Mol Sci*, 1760.
- Evers, R., Kool, M., van Deemter, L., Jansen, H., Calafat, J., Oomen, L., vd., 1998. Drug export activity of the human canalicular multispecific organic anion transporter in polarized kidney MDCK cells expressing cMOAT (MRP-2) cDNA, *J Clin Invest*, 1310–9.
- Fabre, C., Mimura, N., Bobb, K., Kong, S., Gorgun, G., Cirstea, D., vd., 2012. Dual inhibition of canonical and noncanonical NF-kappaB pathways demonstrates significant antitumor activities in multiple myeloma, *Clin Cancer Res*, 4669-4681.
- Fan, D., Beltran, P., O'Brien, C., 1994. Reversal of multidrug resistance, J. Kellen içinde, *Reversal of Multidrug Resistance in Cancer* (93–24), Boca Raton, FL, CRC Press.
- Fernández-Checa, J., Takikawa, H., Horie, T., Ookhtens, M., Kaplowitz, N., 1992. Canalicular transport of reduced glutathione in normal and mutant Eisai hyperbilirubinemic rats, *J Biol Chem*, 1667-73.
- Filipits, M., 2004. Mechanisms of cancer: multidrug resistance, *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms/Cancer*, 229-234.
- Finlayson, A., Freeman, K., 2009. A cell motility screen reveals role for MARCKS-related protein in adherens junction formation and tumorigenesis, *Plos One*, e7833.
- Fisher, D., 1994. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold, *Cell*, 539-542.
- Flatgaard, J., Bauer, K., Kauvar, L., 1993. Isozyme specificity of novel glutathione-S-transferase inhibitors, *Cancer Chemother Pharmacol*, 63-70.
- Fletcher, J., Haber, M., Henderson, M., Norris, M., 2010. ABC transporters in cancer: more than just efflux pumps, *Nat Rev Cancer*, 147–156.

- Fojo, A., Whang-Peng, J., Gottesmann, M., Pastan, I., 1985. Amplification of DNA sequences in human multidrug resistant KB carcinoma cells, *Proceedings National Academy of Sciences USA*, 7661-5.
- Fonseca, R., Barlogie, B., Bataille, R., Bastard, C., Bergsagel, P., Chesi, M., vd., 2004. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report, *Cancer Res*, 1546–58.
- Fonseca, R., Bergsagel, P., Drach, J., Shaughnessy, J., Gutierrez, N., Stewart, A., vd., 2009. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review, *Leukemia*, 2210-2221.
- Fonseca, R., Blood, E., Oken, M. vd., 2002. Myeloma and the t(11;14)(q13;q32): evidence for a biologically defined unique subset of patients, *Blood*, 3735–3741.
- Fonseca, R., Blood, E., Rue, M., Harrington, D., Oken, M., Kyle, R., vd., 2003. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma, *Blood*, 4569-4575.
- Ford, F., Hait, W., 1991. Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer, *Pharmacol Rew*, 155-159.
- Ford, J., Yang, J., Hait, W., 1996. P-glycoprotein-mediated multidrug resistance: experimental and clinical strategies for its reversal, W. Hait vd. içinde, *Drug resistance (3–39)*, Boston (MA), Kluwer Academic Publishers.
- Franco, R., Cidlowski, J., 2009. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant, *Cell Death Differ*, 1303-14.
- Franke, N., Niewerth, D., Assaraf, Y., van Meerloo, J., Vojtekova, K., van Zantwijk, C., vd., 2012. Impaired bortezomib binding to mutant beta 5 subunit of the proteasome is the underlying basis for bortezomib resistance in leukemia cells, *Leukemia*, 757–68.
- Friedenberg, W., Rue, M., Blood, E., Dalton, W., Shustik, C., Larson, R., vd., 2006. Phase III study of PSC-833 (valsopodar) in combination with vincristine, doxorubicin, and dexamethasone (valsopodar/VAD) versus VAD alone in patients with recurring or refractory multiple myeloma (E1A95): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group, *Cancer*, 830-838.
- Fromm, M., 2004. Importance of P-glycoprotein at blood–tissue barriers, *Trends Pharmacol Sci*, 423–429.
- Fuchs, D., Berges, C., Opelz, G., Daniel, V., Naujokat, C., 2008. Increased expression and altered subunit composition of proteasomes induced by continuous proteasome inhibition establish apoptosis resistance and hyperproliferation of Burkitt lymphoma cells, *J Cell Biochem*, 270-83.
- Fuchs, O., 2013. Targeting of NF-kappaB Signaling Pathway, other Signaling Pathways and Epigenetics in Therapy of Multiple Myeloma, *Cardiovascular Haematological Disorders-Drug Targets*, 16-34.

- Gabrea, A., Martelli, M., Qi, Y. vd., 2008. Secondary genomic rearrangements involving immunoglobulin or MYC loci show similar prevalences in hyperdiploid and non-hyperdiploid myeloma tumors, *Genes Chromosom Cancer*, 573–590.
- Gao, M., Loe, D., Grant, C., Cole, S., Deeley, R., 1996. Reconstitution of ATP-dependent LTC₄ transport by co-expression of both half molecules of human MRP in insect cells, *J Biol Chem*, 27782–27787.
- Garraway, L., Janne, P., 2012. Circumventing cancer drug resistance in the era of personalized medicine, *Cancer Discov*, 214–226.
- Gekeler, V., Boer, R., Ise, W., Sanders, K., Schächtele, C., Beck, J., 1995a. The specific bisindolylmaleimide PKC-inhibitor GF 109203X efficiently modulates MRP-associated multiple drug resistance, *Biochem Biophys Res Commun*, 119–26.
- Gekeler, V., Ise, W., Sanders, K., Ulrich, W., Beck, J., 1995b. The leukotriene LTD₄ receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance, *Biochem Biophys Res Commun*, 345–352.
- Germann, U., 1996. P-glycoprotein-a mediator of multidrug resistance in tumour cells, *Eur J Cancer*, 927–44.
- Gertz, M., Lacy, M., Dispenzieri, A. vd., 2005. Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16;. 3;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy, *Blood*, 2837–2840.
- Gilbert, L., Elwood, L., Merino, M., Masood, S., Barnes, R., Steinberg, S. vd., 1993. A pilot study of pi-class glutathione S-transferase expression in breast cancer: correlation with estrogen receptor expression and prognosis in node-negative breast cancer, *J Clin Oncol*, 49–58.
- Gillet, J. P., Efferth, T., Remacle, J., 2007. Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 237–262.
- Glickman, M., Ciechanover, A., 2002. The ubiquitin–proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction, *Physiol Rev*, 373–428.
- Golalipour, M., Mahjoubi, F., Sanati, M., 2006. RNAi Induced Inhibition of MRP-1 Expression and Reversal of Drug Resistance in Human Promyelocytic HL60 Cell Line, *Iranian Journal of Biotechnology*, 169–173.
- Goldberg, A., 2010. Bortezomib's Scientific Origins and Its Tortuous Path to the Clinic, K. Anderson, P. Richardson, I. Ghobrial içinde, *Bortezomib in the Treatment of Multiple Myeloma* (1–27), Basel, Springer.
- Goldie, J., Coldman, A., 1983. Quantitative model for multiple levels of drug resistance in clinical tumors, *Cancer Treatment Reports*, 923–30.

- Goler-Baron, V., Assaraf, Y. G., 2012. Overcoming multidrug resistance via photodestruction of ABCG2-rich extracellular vesicles sequestering photosensitive chemotherapeutics, *Plos One*, e35487.
- Gollapudi, S., Gupta, S., 1992. Lack of reversal of daunorubicin resistance in HMO/AR cells by cyclosporin A, *Anticancer Res*, 2127-2132.
- Gollapudi, S., Thadepalli, F., Kim, C., Gupta, S., 1995. Difloxacin reverses multidrug resistance in HL-60/AR cells that overexpress the multidrug resistance-related protein (MRP) gene, *Oncol Res*, 213-25.
- Gomes, A., 2013. Genetics of proteasome diseases, *Scientifica (Cairo)* , 637629.
- Gorgels, T., Hu, X., Scheffer, G., van der Wal, A., Toonstra, J., de Jong, P., vd., 2005. Disruption of Abcc6 in the mouse: novel insight in the pathogenesis of pseudoxanthoma elasticum, *Hum Mol Genet*, 1763–1773.
- Gosh, S., Karin, M., 2002. Missing pieces in the NF-kB puzzle, *Cell*, 81–96.
- Gottesman, M., 2002. Mechanisms of cancer drug resistance, *Annu Rev Med*, 615-27.
- Gottesman, M. M., Fojo, T., Bates, S. E., 2002. Multidrug resistance in cancer role of ATP dependent transporters, *Nat Rev*, 48-58.
- Greco, C., D'Agnano, I., Vitelli, G., Vona, R., Marino, M., Mottotese, M., vd., 2006. c-MYC deregulation is involved in melphalan resistance of multiple myeloma: role of PDGF-BB, *Int J Immunopathol Pharmacol*, 67-79.
- Green, J., Robertson, L., Clark, A., 1993. Glutathione S-transferase expression in benign and malignant ovarian tumors, *Br J Cancer*, 235-239.
- Greil, R., Fasching, B., Loidl, P., Huber, H., 1991. Expression of the c-myc proto-oncogene in multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia: an in situ analysis, *Blood*, 180-191.
- Greipp, R., Kyle, R., 1982. Clinical, morphological and cell kinetic differences among multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and smoldering myeloma, *Blood*, 161–71.
- Grignon, D., Abdel-Malak, M., Mertens, W., Sakr, W., Shepherd, R., 1994. Glutathione S-transferase expression in renal cell carcinoma: a new marker of differentiation, *Mod Pathol*, 186-189.
- Groettrup, M., Kirk, C., Basler, M., 2010. Proteasomes in immune cells: more than peptide producers?, *Nat Rev Immunol*, 73–78.
- Grogan, T., Spier, C., Salmon, S., Matzner, M., Rybski, J., Weinstein, R., vd., 1993. P-glycoprotein expression in human plasma cell myeloma: correlation with prior chemotherapy, *Blood*, 490–495.

- Groll, M., Huber, R., 2004. Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a structural approach, *Biochim Biophys Acta*, 33–44.
- Groll, M., Berkers, C., Ploegh, H., Ovaas, H., 2006. Crystal structure of the boronic acid-based proteasome inhibitor bortezomib in complex with the yeast 20S proteasome, *Structure*, 451–456.
- Guo, Y., Kock, K., Ritter, C., Chen, Z., Grube, M., Jedlitschky, G., vd., 2009. Expression of ABCC type nucleotide exporters in blasts of adult acute myeloid leukemia: relation to long-term survival, *Clin Cancer Res*, 1762–9.
- Guo, Y., Kotova, E., Chen, Z., Lee, K., Hopper-Borge, E., Belinsky, M., vd., 2003. MRP-8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl)adenine, *J Biol Chem*, 29509–29514.
- Gupta, D., Treon, S., Shima, Y., Hideshima, T., Podar, K., Tai, Y., vd., 2001. Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications, *Leukemia*, 1950–1961.
- Hagmann, W., Jesnowski, R., Faissner, R., Guo, C., Lohr, J., 2009. ATP-binding cassette C transporters in human pancreatic carcinoma cell lines. Upregulation in 5-fluorouracil-resistant cells, *Pancreatology*, 136–44.
- Hajek, R., Siegel, D., Orlowski, R., Ludwig, H., Palumbo, A., Dimopoulos, M., 2014. The Role of Hdac Inhibitors in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma, *Leuk Lymphoma*, 11–18.
- Hallek, M., Bergsagel, P., Anderson, K., 1998. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process, *Blood*, 3–21.
- Hamada, S., Kamada, M., Furumoto, H., Hirao, T., Aono, T., 1994. Expression of Glutathione S-transferase-pi in human ovarian cancer as an indicator of resistance to chemotherapy, *Gynecol Oncol*, 313–319.
- Hamdy, A., 2012. Cancer therapy and vaccination, *Journal of Immunological Methods*, 1–23.
- Hanahan, D., Weinberg, R., 2000. The hallmarks of cancer, *Cell* 100, 57.
- Hanaka, H., Pawelzik, S., Johnsen, J., Raknoff, M., Terawki, K., Rasmuson, A., vd., 2009. Microsomal prostaglandin E synthase 1 determines tumor growth in vivo of prostate and lung cancer cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 18757–18762.
- Hao, M., Zhang, L., An, G., Sui, W., Yu, Z., Zou, D., vd., 2011. Suppressing miRNA-15a/-16 expression by interleukin-6 enhances drug-resistance in myeloma cells, *J Hematol Oncol*, 37.
- Hao, X., Widersten, M., & Ridderstrom, M. vd., 1994. Covariation of glutathione transferase expression and cytostatic drug resistance in HeLa cells:

- establishment of class Mu glutathione transferase M3-3 as the dominating isoenzyme, *Biochem J*, 59–67.
- Hardin, J., MacLeod, S., Grigorieva, I., Chang, R., Barlogie, B., Xiao, H., vd., 1994. Interleukin-6 prevents dexamethasone-induced myeloma cell death, *Blood*, 3063-3070.
- Hasegawa, M., Kusuhara, H., Adachi, M., Schuetz, J., Takeuchi, K., Sugiyama, Y., 2007. Multidrug resistance-associated protein 4 is involved in the urinary excretion of hydrochlorothiazide and furosemide, *J Am Soc Nephrol*, 37–45.
- Hayashi, T., Hideshima, T., Anderson, K., 2003. Novel therapies for multiple myeloma, *Br J Haematol*, 10–17.
- Hayes, J., McLellan, L., 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress, *Free Radic, Res*, 273-300.
- Hayes, J., Pulford, D., 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance, *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 445-600.
- Hayes, J., Flanagan, J., Jowsey, I., 2005. Glutathione transferases, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 51-88.
- Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U., Wolf, D., 1997. The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing, *J Biol Chem*, 25200–25209.
- Hendil, K., Khan, S., Tanaka, K., 1998. Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20S proteasomes, *Biochem J*, 749–754.
- Hershko, A., Ciechanover, A., 1998. The ubiquitin system, *Annu Rev Biochem*, 425–479.
- Hershko, A., Ciechanover, A., Varshavsky, A., 2000. Basic Medical Research Award. The ubiquitin system, *Nat Med*, 1073–1081.
- Heuck, C., Mehta, J., Bhagat, T., Gundabolu, K., Yu, Y., vd., 2013. Myeloma is characterized by stage specific alterations in DNA methylation that occur early during myelomagenesis, *J Immunol*, 2966–2975.
- Hideshima, T., Catley, L., Raje, N., Chauhan, D., Podar, K., Mitsiades, C., vd., 2007. Inhibition of Akt induces significant downregulation of survivin and cytotoxicity in human multiple myeloma cells, *Br J Haematol*, 783–791.
- Hideshima, T., Chauhan, D., Ishitsuka, K., Yasui, H., Raje, N., Kumar, S., vd., 2005. Molecular characterization of PS-341 (bortezomib) resistance: implications for overcoming resistance using lysophosphatidic acid acyltransferase (LPAAT)-b inhibitors, *Oncogene*, 3121–3129.

- Hideshima, T., Chauhan, D., Podar, K., Schlossman, R., Richardson, P., Anderson, K., 2001. Novel therapies targeting the myeloma cell and its bone marrow microenvironment, *Semin Oncol*, 607–12.
- Hideshima, T., Chauhan, D., Richardson, P., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Hayashi, T., vd., 2002. NF kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma, *J Biol Chem*, 16639–16647.
- Hideshima, T., Mitsiades, C., Akiyama, M., Hayashi, T., Chauhan, D., Richardson, P., vd., 2003. Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341, *Blood*, 1530-4.
- Hipfner, D., Deeley, R., Cole, S., 1999. Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP-1, *Biochim Biophys Acta*, 359–76.
- Hirohashi, T., Suzuki, H., Sugiyama, Y., 1999. Characterization of the transport properties of cloned rat multidrug resistance-associated protein 3 (MRP-3), *J Biol Chem*, 15181-5.
- Hirohashi, T., Suzuki, H., Ito, K., Ogawa, K., Kume, K., Shimizu, T., vd., 1998. Hepatic expression of multidrug resistance-associated protein-like proteins maintained in eisai hyperbilirubinemic rats, *Mol Pharmacol*, 1068-75.
- Hirouchi, M., Kusuvara, H., Onuki, R., Ogilvie, B., Parkinson, A., Sugiyama, Y., 2009. Construction of triple transfected cells [organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1/multidrug resistance associated protein (MRP) 2/MRP-3 and OATP1B1/MRP-2/MRP-4] for analysis of the sinusoidal function of MRP-3 and MRP-4, *Drug Metab Dispos*, 2103–2111.
- Hitzerd, S., Verbrugge, S., Ossenkoppele, G., Jansen, G., Peters, G., 2014. Positioning of aminopeptidase inhibitors in next generation cancer therapy, *Amino Acids*, 793–808.
- Hlavata, I., Mohelnikova-Duchonova, B., Vaclavikova, R., Liska, V., Pitule, P., Novak, P., vd., 2012. The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer, *Mutagenesis*, 187–96.
- Ho, L., Kench, J., Handelsman, D., Scheffer, G., Stricker, P., Grygiel, J., vd., 2008. Androgen regulation of multidrug resistance associated protein 4 (MRP-4/ABCC4) in prostate cancer, *Prostate*, 1421–1429.
- Hoeller, D., Dikic, I., 2009. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy, *Nature*, 438–44.
- Holkova, B., Grant, S., 2012. Proteasome inhibitors in mantle cell lymphoma, *Best Practice Research Clinical Haematology*, 133–141.
- Hollenstein, K., Dawson, R., Locher, K., 2007. Structure and mechanism of ABC transporter proteins, *Curr Opin Struct Biol*, 412-8.

- Hollo, Z., Homolya, L., Hegedus, T., Sarkadi, B., 1996. Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumour cells, *FEBS Lett*, 99–104.
- Holm, P., Dietel, M., Krupp, G., 1995. Similar cleavage efficiencies of an oligoribonucleotide substrate and an *mdr1* mRNA segment by a hammerhead ribozyme, *Gene*, 221–225.
- Hopper, E., Belinsky, M., Zeng, H., Tosolini, A., Testa, J., Kruh, G., 2001. Analysis of the structure and expression pattern of MRP-7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily, *Cancer Lett*, 181–191.
- Hopper-Borge, E., Chen, Z., Shchaveleva, I., Belinsky, M., Kruh, G., 2004. Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): resistance to docetaxel, *Cancer Res*, 4927–4930.
- Hopper Borge, E., Xu, X., Shen, T., Shi, Z., Chen, Z., Kruh, G., 2009. Human multidrug resistance protein 7 (ABCC10) is a resistance factor for nucleoside analogues and epothilone B, *Cancer Res*, 178–184.
- Hoque, M., Cole, S., 2008. Down-regulation of Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1 increases expression and function of multidrug resistance protein 4, *Cancer Res*, 4802–9.
- Hoque, M., Conseil, G., Cole, S., 2009. Involvement of NHERF1 in apical membrane localization of MRP-4 in polarized kidney cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 60–64.
- Hu, S., Niu, H., Inaba, H., Orwick, S., Rose, C., Panetta, J., vd., 2011. Activity of the multikinase inhibitor sorafenib in combination with cytarabine in acute myeloid leukemia, *J Natl Cancer Inst*, 893–905.
- Hu, X., Plomp, A., Wijnholds, J., Ten Brink, J., van Soest, S., van den Born, L., vd., 2003. ABCC6/MRP-6 mutations: further insight into the molecular pathology of pseudoxanthoma elasticum, *Eur J Hum Genet*, 215–24.
- Huang, W., Ju, T., Hung, M., Chen, C., 2007. Phosphorylation of CBP by IKK α promotes cell growth by switching the binding preference of CBP from p53 to NF-kappaB, *Mol Cell*, 75–87.
- Huber, E., Groll, M., 2012. Inhibitors for the immuno- and constitutive proteasome: current and future trends in drug development, *Angew Chem Int Ed Engl*, 8708–8720.
- Huber, E., Basler, M., Schwab, R., Heinemeyer, W., Kirk, C., Groettrup, M., vd., 2012. Immuno and constitutive proteasome crystal structures reveal differences in substrate and inhibitor specificity, *Cell*, 727–738.
- Huber, E., Heinemeyer, W., Groll, M., 2015. Bortezomib-resistant mutant proteasomes: structural and biochemical evaluation with carfilzomib and ONX 0914, *Structure*, 407–417.

- Huisman, M., Chhatta, A., van Tellingen, O., Beijnen, J., Schinkel, A., 2005. MRP-2 (ABCC2) transports taxanes and confers paclitaxel resistance and both processes are stimulated by probenecid, *Int J Cancer*, 824–829.
- Iijima, M., Momose, I., Ikeda, D., 2010. Increased ABCB1 expression in TP-110-resistant RPMI-8226 cells, *Biosci Biotechnol Biochem*, 1913–1919.
- Iram, S., Cole, S., 2011. Expression and Function of Human MRP-1 (ABCC1) Is Dependent on Amino Acids in Cytoplasmic Loop 5 and Its Interface with Nucleotide Binding Domain 2, *J Biol Chem*, 7202–13.
- Ishikawa, T., 1989. ATP/Mg²⁺-dependent cardiac transport system for glutathione S-conjugates. A study using rat heart sarcolemma vesicles, *J Biol Chem*, 17343–8.
- Ishikawa, T., 1992. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump, *Trends Biochem Sci*, 463–8.
- Ishikawa, T., Bao, J., Yamane, Y., Akimaru, K., Frindrich, K., Wright, C. vd., 1996. Coordinated induction of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase by heavy metals in human leukemia cells, *J Biol Chem*, 14981–8.
- Ishikawa, T., Müller, M., Klünemann, C., Schaub, D., Keppler, D., 1990. ATP dependent primary active transport of cysteinyl leuokotrienes across liver canalicular membrane. Role of ATP dependent transport system for glutathione S- conjugates, *J Biol Ch*, 19279–86.
- Jagannath, S., Barlogie, B., Berenson, J., Siegel, D., Irwin, D., Richardson, P., vd., 2008. Updated survival analyses after prolonged follow-up of the phase 2, multicenter CREST study of bortezomib in relapsed or refractory multiple myeloma, *Br J Haematol*, 537–40.
- Jagannath, S., Richardson, P., Sonneveld, P., Schuster, M., Irwin, D., Stadtmauer, E., vd., 2007. Bortezomib appears to overcome the poor prognosis conferred by chromosome 13 deletion in phase 2 and 3 trials, *Leukemia*, 151–7.
- Jain, R., 1987. Transport of molecules in the tumour interstitium: a review, *Cancer Res*, 3039–51.
- Jakobsson, P., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., Persson, B., 1999. Common structural features of MAPEG-a wide spread super family of associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism, *Protein Sci*, 689–692.
- Jedlitschky, G., Burchell, B., Keppler, D., 2000. The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP dependent export pump for cyclic nucleotides, *J Biol Chem*, 30069–30074.
- Jedlitschky, G., Leier, I., Buchholz, U., Barnouin, K., Kurz, G., Keppler, D., 1996. Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump, *Cancer Res*, 988–94.

- Jedlitschky, G., Leier, I., Buchholz, U., Center, M., Keppler, D., 1994. ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein, *Cancer Res*, 4833–6.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Thun, M., 2009. Cancer statistics, 2009, *CA Cancer J Clin.*, 225–49.
- Jia, L., Gopinathan, G., Sukumar, J., Gribben, J., 2012. Blocking autophagy prevents bortezomib-induced NF κ B activation by reducing I κ B alpha degradation in lymphoma cells, *Plos One*, e32584.
- Jiang, A., Reece, D., Chang, H., 2012. Genomic stratification of multiple myeloma treated with novel agents, *Leuk Lymphoma*, 202-207.
- Johnsen, A., France, J., Sy, M., Lines, C., Harding, C., 1998. Down-regulation of the transporter for antigen presentation, proteasome subunits, and class I major histocompatibility complex in tumor cell lines, *Cancer Res*, 3660–3667.
- Joza, N., Susin, S., Daugas, E., Stanford, W., Cho, S., Li, C., vd., 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis inducing factor in programmed cell death, *Nature*, 549-594.
- Juliano, R., Ling, V., 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants, *Biochim Biophys Acta*, 152–62.
- Kale, A., Moore, B., 2012. Molecular mechanisms of acquired proteasome inhibitor resistance, *J Med Chem*, 10317–10327.
- Kale, A., McGlinchey, R., Lechner, A., Moore, B., 2011. Bacterial self-resistance to the natural proteasome inhibitor salinosporamide A, *ACS Chem Biol*, 1257–1264.
- Kalff, A., Spencer, A., 2012. The t(4;14) translocation and FGFR3 overexpression in multiple myeloma: prognostic implications and current clinical strategies, *Blood Cancer J*, e89.
- Kanda, D., Takagi, H., Kawahara, Y., Yata, Y., Takakusagi, T., Hatanaka, T., vd., 2009. Novel large-scale deletion (whole exon 7) in the ABCC2 gene in a patient with the Dubin-Johnson syndrome, *Drug Metab Pharmacokinet*, 464–8.
- Kao, H., Chang, M., Cheng, J., Huang, J., 2003. Genomic structure, gene expression, and promoter analysis of human multidrug resistance-associated protein 7, *J Biomed Sci*, 98–110.
- Kapse-Mistry, S., Govender, T., Srivastava, R., Yergeri, M., 2014. Nanodrug delivery in reversing multidrug resistance in cancer cells, *Frontiers in Pharmacology*, 1-22.
- Kara, Z., Öztürk, N., Öztürk, D., Okyar, A., 2013. ABC Taşıyıcı Proteinleri: Sirkadiyan Ritimler ve Cinsiyete Bağlı Farklılıklar, *MÜSBED*, 1-13.

- Karin, M., 2006. Nuclear factor-kB in cancer development and progression, *Nature*, 431–436.
- Karla, P., Quinn, T., Herndon, B., Thomas, P., Pal, D., Mitra, A., 2009. Expression of multidrug resistance associated protein 5 (MRP-5) on cornea and its role in drug efflux, *J Ocul Pharmacol Ther*, 121–32.
- Kartenbeck, J., Leuschner, U., Mayer, R., Keppler, D., 1996. Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome, *Hepatology*, 1061–6.
- Kawabe, T., Chen, Z., Wada, M., Uchiumi, T., Ono, M., Akiyama, S., vd., 1999. Enhanced transport of anticancer agents and leukotriene C4 by the human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT/MRP-2), *FEBS Lett*, 327–31.
- Keats, J., Fonseca, R., Chesi, M., Schop, R., Baker, A., Chng, W., vd., 2007. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma, *Cancer Cell*, 131–44.
- Keats, J., Reiman, T., Maxwell, C. vd., 2003. In multiple myeloma t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression, *Blood*, 1520–1529.
- Keppler, D., 1999. Export pumps for glutathione s-conjugates, *Free Radical Biology Medicine*, 985–991.
- Keppler, D., Konig, J., 1997. Hepatic canalicular membrane 5: Expression and localization of the conjugate export pump encoded by the MRP-2 (cMRP/cMOAT) gene in liver, *FASEB J*, 509–16.
- Keppler, D., Leier, I., Jedlitschky, G., Konig, J., 1998. ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance protein MRP-1 and its apical isoform MRP-2, *Chem Biol Interact*, 153–61.
- Kerr, J.F., Winterford, C.M., 1994. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy, *Cancer*, 2013–2026.
- Keshet, G. I., Goldstein, I., Itzhaki, O., Cesarkas, K., Shenhav, L., Yakirevitch, A., vd., 2008. MDR1 expression identifies human melanoma stem cells, *Biochem and Biophys Res Comm*, 930–936.
- Kiehntopf, M., Brach, M., Licht, T., Petschauer, S., Karawajew, L., Kirschning, C., vd., 1994. Ribozyme-mediated cleavage of the MDR-J transcript restores chemosensitivity in previously resistant cancer cells, *EMBO J*, 4645–4652.
- Kincaid, E., Che, J., York, I., Escobar, H., Reyes-Vargas, E., Delgado, J., vd., 2012. Mice completely lacking immuno proteasomes show major changes in antigen presentation, *Nat Immunol*, 129–135.
- King, R., Deshaies, R., Peters, J., Kirschner, M., 1996. How proteolysis drives the cell cycle, *Science*, 1652–59.

- Kisselev, A. F., van der Linden, W. A., Overkleeft, H. S., 2012. Proteasome Inhibitors: An Expanding Army Attacking a Unique Target, *Chemistry Biology*, 99-115.
- Kisselev, A., Goldberg, A., 2001. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates, *Chem Biol*, 739–758.
- Kisselev, A., Callard, A., Goldberg, A., 2006. Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate, *J Biol Chem*, 8582–8590.
- Kitamura, A., Maekawa, Y., Uehara, H., Izumi, K., Kawachi, I., Nishizawa, M., vd., 2011. A mutation in the immunoproteasome subunit PSMB8 causes autoinflammation and lipodystrophy in humans, *J Clin Invest*, 4150–4160.
- Kitamura, T., Jansen, P., Hardenbrook, C., Kamimoto, Y., Gatmaitan, Z., Arias, I., 1990. Defective ATP-dependent bile canalicular transport of organic anions in mutant (TR-) rats with conjugated hyperbilirubinemia, *Proc Natl Acad Sci USA*, 3557-61.
- Klement, J., Matsuzaki, Y., Jiang, Q., Terlizzi, J., Choi, H., Fujimoto, N., vd., 2005. Targeted ablation of the *abcc6* gene results in ectopic mineralization of connective tissues, *Mol Cell Biol*, 8299–310.
- Kloetzel, P., 2001. Antigen processing by the proteasome, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 179–187.
- Kloetzel, P., Ossendorp, F., 2004. Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation, *Curr Opin Immunol*, 76–81.
- Kniepert, A., Groettrup, M., 2014. The unique functions of tissue-specific proteasomes, *Trends Biochem Sci*, 17–24.
- Knudson, A., 2001. Two genetic hits (more or less) to cancer, *Nat Rev Cancer* 1, 157.
- Koike, K., Kawabe, T., Tanaka, T., Toh, S., Uchiumi, T., Wada, M., vd., 1997. A canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) antisense cDNA enhances drug sensitivity in human hepatic cancer cells, *Cancer Res*, 5475-9.
- Kondo, T., Dale, G., Beutler, E., 1980. Glutathione transport by inside-out vesicles from human erythrocytes, *Proc Natl Acad Sci USA*, 6359-62.
- Kondo, T., Murao, M., Taniguchi, N., 1982. Glutathione S-conjugate transport using inside-out vesicles from human erythrocytes, *Eur J Biochem*, 551-4.
- Konig, J., Nies, A., Cui, Y., Leier, I., Keppler, D., 1999a. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP-2-mediated drug resistance, *Biochim Biophys Acta*, 377–94.

- Konig, J., Rost, D., Cui, Y., Keppler, D., 1999b. Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP-3 localized to the basolateral hepatocyte membrane, *Hepatology*, 1156–63.
- Konukoğlu, D., Akçay, T., 1995. Glutasyon Metabolizması ve Klinik Önemi, *T Klin Tıp Bilimleri*, 214-218.
- Kool, M., de Haas, M., Scheffer, G., Scheper, R., van Eijk, M., Juijn, J., vd., 1997. Analysis of expression of cMOAT (MRP-2), MRP-3, MRP-4, and MRP-5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP-1), in human cancer cell lines, *Cancer Res*, 3537-47.
- Kool, M., Van der Linden, M., De Haas, M., Baas, F., Borst, P., 1999a. Expression of human MRP-6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP-1, in tissues and cancer cells, *Cancer Res*, 175-182.
- Kool, M., van der Linden, M., de Haas, M., Scheffer, G., de Vree, J., Smith, A. J., 1999b. MRP-3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs, *Proc Natl Acad Sci USA*, 6914-9.
- Korita, P., Wakai, T., Shirai, Y., Matsuda, Y., Sakata, J., Takamura, M., vd., 2010. Multidrug resistance-associated protein 2 determines the efficacy of cisplatin in patients with hepatocellular carcinoma, *Oncol Rep*, 965–72.
- Kortuem, K., Stewart, A. 2013. Carfilzomib, *Blood*, 893–897.
- Kraus, M., Ruckrich, T., Reich, M., Gogel, J., Beck, A., Kammer, W., vd., 2007. Activity patterns of proteasome subunits reflect bortezomib sensitivity of hematologic malignancies and are variable in primary human leukemia cells, *Leukemia*, 84–92.
- Krause, M., Oliveira, L., Silveira, E., Vianna, D., Rossato, J., Almeida, B., vd., 2007. MRP-1/GS-X pump ATPase expression: is this the explanation for the cytoprotection of the heart against oxidative stress-induced redox imbalance in comparison to skeletal muscle cells?, *Cell Biochem Funct*, 23–32.
- Krishan, A., Fitz, C. M., Andritsch, I., 1997. Drug retention, efflux and resistance in tumor cells, *Cytometry*, 279-85.
- Krishnamachary, N., Center, M., 1993. The MRP gene associated with a non-P-glycoprotein multidrug resistance encodes a 190-kDa membrane bound glycoprotein, *Cancer Res*, 3658–3661.
- Krishnamurthy, P., Schwab, M., Takenaka, K., Nachagari, D., Morgan, J., Leslie, M., vd., 2008. Transporter mediated protection against thiopurine induced hematopoietic toxicity, *Cancer Res*, 4983–4989.
- Kruh, G., Belinsky, M., Gallo, J., Lee, K., 2007a. Physiological and pharmacological functions of MRP-2, MRP-3 and MRP-4 as determined from recent studies on gene disrupted mice, *Cancer Metastasis Rev*, 5–14.

- Kruh, G., Guo, Y., Hopper-Borge, E., Belinsky, M., Chen, Z., 2007b. ABCC10, ABCC11, and ABCC12, *Pflugers Arch*, 675-684.
- Krüger, E., Kuckelkorn, U., Sijts, A., Kloetzel, P., 2003. The components of the proteasome system and their role in MHC class I antigen processing, *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 81-104.
- Kuehl, W., Bergsagel, P., 2002. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions, *Nat Rev Cancer*, 175-87.
- Kuhn, D., Berkova, Z., Jones, R., Woessner, R., Bjorklund, C., Ma, W., vd., 2012. Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor to overcome bortezomib resistance in preclinical models of multiple myeloma, *Blood*, 3260-3270.
- Kumar, S., 2010. Multiple myeloma – current issues and controversies, *Cancer Treatment Reviews*, 3-11.
- Kumar, S., Fonseca, R., Ketterling, R., Dispenzieri, A., Lacy, M., Gertz, M., vd., 2012. Trisomies in multiple myeloma: Impact on survival in patients with high-risk cytogenetics, *Blood*, 2100-2105.
- Kuo, M., Bao, J., Furuichi, M., Yamane, Y., Gomi, A., Savaraj, N. vd., 1998. Frequent coexpression of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase mRNA in drug-resistant cells, untreated tumor cells, and normal mouse tissues, *Biochem Pharmacol*, 605-15.
- Kuss, B., O'Neill, G., Eyre, H., Doggett, N., Callen, D., Davey, R., 1998. ARA, a novel ABC transporter, is located at 16p13.1, is deleted in inv (16) leukemias and is shown to be expressed in primitive hematopoietic precursors, *Genomics*, 455-8.
- Kusuhara, D., Sugiyama, Y., 2002. Role of transporters in the tissue selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, small intestine, brain and kidney, *J Control Release*, 43-54.
- Kuwano, M., Uchiumi, T., Hayakawa, H., Ono, M., Wada, M., Izumi, H., vd., 2003. The basic and clinical implications of ABC transporters, Y-box-binding protein-1 (YB-1) and angiogenesis-related factors in human malignancies, *Cancer Sci*, 9-14.
- Kyle, R., 1993. Benign monoclonal gammopathy: after 20 to 35 years of follow-up, *Mayo Clin Proc*, 26-36.
- Kyle, R. A., Rajkumar, S. V., 2004. Multiple Myeloma, *N Engl J Med*, 1860-1873.
- Kyle, R., Katzmann, J., 1997. Immunochemical characterization of immunoglobulins, J. Folds, D. Normansell vd. içinde, *Manual of clinical laboratory immunology*, 5th edn (156-76). Washington DC, American Society for Microbiology.
- Laborde, E., 2010. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death, *Cell Death Differ*, 1373-80.

- Lacave, R., Coulet, F., Ricci, S., Touboul, E., Flahault, A., Rateau, J. G., vd., 1998. Comparative evaluation by semiquantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of MDR1, MRP and GSTp gene expression in breast carcinomas, *British Journal of Cancer*, 694-702.
- Ladner, J. P., 2004. Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class kappa enzyme rGSTK1-1, *Biochemistry*, 352-361.
- Lagas, J., Fan, L., Wagenaar, E., Vlaming, M., van Tellingen, O., Beijnen, J., vd., 2010. P-glycoprotein (P-gp/Abcb1), Abcc2, and Abcc3 determine the pharmacokinetics of etoposide, *Clin Cancer Res*, 130-40.
- Lagas, J., Vlaming, M., Schinkel, A., 2009. Pharmacokinetic assessment of multiple ATP binding cassette transporters: the power of combination knockout mice, *Mol Interventions*, 136-145.
- Lage, H., 2003. Abc transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers, *Int J Antimicrob Agents*, 188-199.
- Lage, H., 2008. An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem, *Cell Mol Life Sci*, 3145-67.
- Lautier, D., Canitrot, Y., Deeley, R. G., Cole, S. P., 1996. Multidrug Resistance Mediated by the Multidrug Resistance Protein (MRP) Gene, *Biochemical Pharmacology*, 967-977.
- Le Baccon, P., Leroux, D., Dascalescu, C. vd., 2001. Novel evidence of a role for chromosome 1 pericentric heterochromatin in the pathogenesis of b-cell lymphoma and multiple myeloma, *Genes Chrom Cancer*, 250-264.
- LeBlanc, R., Catley, L., Hideshima, T., Lentzsch, S., Mitsiades, C., Mitsiades, N., vd., 2002. Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in a murine model, *Cancer Res*, 4996-5000.
- Lee, C. H., 2010. Reversing agents for ATP binding cassette transporters, *Method Mol Biol*, 325-340.
- Lee, J., Chen, H., Ni, Y., Hsu, H., Chang, M., 2006. Neonatal Dubin-Johnson syndrome: long-term follow-up and MRP-2 mutations study, *Pediatr Res*, 584-9.
- Lee, J., Steelman, L., McCubrey, J., 2004. Phosphatidylinositol 3'-kinase activation leads to multidrug resistance protein-1 expression and subsequent chemoresistance in advanced prostate cancer cells, *Cancer Res*, 8397-8404.
- Lee, S. W., Cho, H. Y., Na, G., Yoo, M. R., Seo, S. K., Hur, D. Y., vd., 2012. CD40 stimulation induces vincristine resistance via AKT activation and MRP-1 expression in a human multiple myeloma cell line, *Immunology Letters*, 41-48.

- Leggas, M., Adachi, M., Scheffer, G., Sun, D., Wielinga, P., Du, G., vd., 2004. MRP-4 confers resistance to topotecan and protects the brain from chemotherapy, *Mol Cell Biol*, 7612–7621.
- Leier, I., Jedlitschky, G., Buchholz, U., Center, M., Cole, S., Deeley, R., vd., 1996. ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump, *Biochem J*, 433-7.
- Leier, I., Jedlitschky, G., Buchholz, U., Cole, S., Deeley, R., Keppler, D., 1994. The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates, *J Biol Chem*, 27807–10.
- Lemontt, J., Azzaria, M., Gros, P., 1988. Increased *mdr* gene expression and decreased drug accumulation in multidrug resistant human melanoma cells, *Cancer Research*, 6348-53.
- Leonard, G., Fojo, T., Bates, S., 2003. The role of ABC transporters in clinical practice, *Oncologist*, 411–424.
- Leslie, E., Bowers, R., Deeley, R., Cole, S., 2003. Structural requirements for functional interaction of glutathione tripeptide analogs with the human multidrug resistance protein 1 (MRP-1), *J Pharmacol Exp Ther*, 643–653.
- Leslie, E., Deeley, R., Cole, S., 2005. Multidrug resistance proteins in toxicology: role of P glycoprotein, MRP-1, MRP-2 and BCRP (ABCG2) in tissue defense, *Toxicol Appl Pharmacol*, 216–237.
- Leung-Hagesteijn, C., Erdmann, N., Cheung, G., Keats, J., Stewart, A., Reece, D., vd., 2013. Xbp1s-negative tumor B cells and preplasmablasts mediate therapeutic proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma, *Cancer Cell*, 289–304.
- Li, B., Wang, H., Orlowski, R., 2013. Proteasome Maturation Protein (pomp) Is Associated With Proteasome Inhibitor Resistance In Myeloma, and Its Suppression Enhances The Activity Of Bortezomib and Carfilzomib, *Blood*, 280.
- Li, C., Krishnamurthy, P., Penmatsa, H., Marrs, K., Wang, X., Zaccolo, M., vd., 2007. Spatiotemporal coupling of cAMP transporter to CFTR chloride channel function in the gut epithelia, *Cell*, 940–951.
- Lias, A., Urban, Z., Seidl, T., Le Saux, O., Sinko, E., Boyd, C., vd., 2002. Loss of ATP-dependent transport activity in pseudoxanthoma elasticum-associated mutants of human ABCC6 (MRP-6), *J Biol Chem*, 16860–7.
- Lichtenstein, A., Tu, Y., Fady, C., Vescio, R., Berenson, J., 1995. Interleukin-6 inhibits apoptosis of malignant plasma cells, *Cell Immunol*, 248-255.
- Lichter, D., Danaee, H., Pickard, M., Tayber, O., Sintchak, M., Shi, H., vd., 2012. Sequence analysis of B subunit genes of the 20S proteasome in patients with relapsed multiple myeloma treated with bortezomib or dexamethasone, *Blood*, 4513–4516.

- Lilienbaum, A., 2013. Relationship between the proteasomal system and autophagy, *Int J Biochem Mol Biol*, 1–26.
- Lin, J. H., Yamazaki, M., 2003. Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications, *Clin Pharmacokinet*, 59-98.
- Lin, Z., Zhu, Y., Johnson, D., Rice, K., Nottoli, T., Hains, B., vd., 2008. Disruption of cAMP and PGE2 transport by MRP-4 deficiency alters cAMP mediated signalling and nociceptive response, *Mol Pharmacol*, 243–251.
- Lincke, C., Smit, J., van der Velde-Koerts, T., Borst, P., 1991. Structure of the human MDR3 gene and physical mapping of the human MDR locus, *J Biol Chem*, 5303–10.
- Ling, Y., Liebes, L., Ng, B., Buckley, M., Elliott, P., Adams, J., vd., 2002. PS-341, a novel proteasome inhibitor, induces bcl-2 phosphorylation and cleavage in association with G2-M phase arrest and apoptosis, *Mol Cancer Ther*, 841–9.
- Ling, Y., Liebes, L., Zou, Y., Perez-Soler, R., 2003b. Reactive oxygen species generation and mitochondrial dysfunction in the apoptotic response to bortezomib, a novel proteasome inhibitor, in human H460 non-small cell lung cancer cells, *J Biol Chem*, 33714–23.
- Ling, Y., Lieves, L., Jiang, J., Holland, J., Elliott, P., Adams, J., vd., 2003a. Mechanism of proteasome inhibitor PS-341 induced G2-M phase arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer cell lines, *Clin Cancer Res*, 1145–54.
- Linsenmeyer, M. E., Jefferson, S., Wolf, M., Matthews, J. P., Board, P. G., Woodcock, D. M., 1992. Levels of expression of the mdrl gene and glutathione S-transferase genes 2 and 3 and response to chemotherapy in multiple myeloma, *Br J Cancer*, 471-475.
- Linton, K., Higgins, C., 2007. Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control, *Pflügers Arch*, 555–567.
- Lipchick, B., Fink, E., Nikiforov, M., 2016. Oxidative stress and proteasome inhibitors in multiple myeloma, *Pharmacol Res*, 210–215.
- Litman, T., Skovsgaard, T., Stein, W., 2003. Pumping of drugs by P-glycoprotein: a two-step process?, *J Pharmacol Exp Ther*, 846-53.
- Liu, Y., Han, T., Giuliano, A., Cabot, M., 2001. Ceramide glycosylation potentiates cellular multidrug resistance, *FASEB J*, 719-730.
- Loe, D., Almquist, K., Cole, S., Deeley, R., 1996a. ATP-dependent 17 beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) transport by multidrug resistance protein (MRP), Inhibition by cholestatic steroids, *J Biol Chem*, 9683-9.
- Loe, D., Almquist, K., Deeley, R., Cole, S., 1996b. Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C4 and chemotherapeutic agents in

- membrane vesicles. Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport, *J Biol Chem*, 9675-82.
- Loe, D., Deeley, R., Cole, S., 1996c. Biology of drug resistance associated with overexpression of the multidrug resistance protein, MRP, *Eur J Cancer*, 945-957.
- Loe, D., Deeley, R., Cole, S., 1998. Characterization of vincristine transport by the Mr 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione, *Cancer Res*, 5130-6.
- Loe, D., Deeley, R., Cole, S., 2000. Verapamil stimulates glutathione transport by the 190-kDa multidrug resistance protein 1 (MRP-1), *J Pharmacol Exp Ther*, 530-8.
- Lonard, D., Nawaz, Z., Smith, C., O'Malley, B., 2000. The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation, *Mol Cell*, 939-48.
- Longhurst, T., O'Neill, G., Harvie, R., Davey, R., 1996. The anthracycline resistance-associated (ara) gene, a novel gene associated with multidrug resistance in a human leukaemia cell line, *Br J Cancer*, 1331-5.
- Longo, D., 2001. Plasma cell disorders, E. Braunwald, D. Kasper, A. Fauci vd. içinde, *Harrison's principles of internal medicine*, 15th edn, vol 1 (727-33), New York, McGraw-Hill Co.
- Loo, T., Bartlett, M., Clarke, D., 2003. Substrate-induced conformational changes in the transmembrane segments of human P-glycoprotein. Direct evidence for the substrate-induced fit mechanism for drug binding, *J Biol Chem*, 13603-6.
- Lorico, A., Rappa, G., Finch, R., Yang, D., Flavell, R., Sartorelli, A., 1997. Disruption of the murine MRP (multidrug resistance protein) gene leads to increased sensitivity to etoposide (VP-16) and increased levels of glutathione, *Cancer Res*, 5238-42.
- Lü, S., Wang, J., 2013. The resistance mechanisms of proteasome inhibitor bortezomib, *Biomarker Research*, 1-9.
- Lü, S., Chen, Z., Yang, J., Chen, L., Gong, S., Zhou, H., vd., 2008a. Overexpression of the PSMB5 gene contributes to bortezomib resistance in T-lymphoblastic lymphoma/leukemia cells derived from Jurkat line, *Exp Hematol*, 1278-84.
- Lü, S., Yang, J., Chen, Z., Gong, S., Zhou, H., Xu, X., vd., 2009. Different mutants of PSMB5 confer varying bortezomib resistance in T lymphoblastic lymphoma/leukemia cells derived from the Jurkat cell line, *Exp Hematol*, 831-837.
- Lü, S., Yang, J., Huang, C., Cheng, H., Wang, J., 2011. Upregulated expression of the PSMB5 gene may contribute to drug resistance in patient with multiple myeloma when treated with bortezomib-based regimen, *Experimental Hematology*, 1117-8.

- Lü, S., Yang, J., Song, X., Gong, S., Zhou, H., Guo, L., vd., 2008b. Point mutation of the proteasome beta5 subunit gene is an important mechanism of bortezomib resistance in bortezomib-selected variants of Jurkat T cell lymphoblastic lymphoma/leukemia line, *J Pharmacol Exp Ther*, 423–431.
- Macauda, A., Castelli, E., Buda, G., Pelosini, M., Butrym, A., Watek, M., vd., 2018. Inherited variation in the xenobiotic transporter pathway and survival of multiple myeloma patients, *Br J Haematol*, 375-384.
- Maes, K., Menu, E., Van Valckenborgh, E., Van Riet, I., Vanderkerken, K., De Bruyne, E., 2013. Epigenetic modulating agents as a new therapeutic approach in multiple myeloma, *Cancers*, 430-61.
- Mahajan, S., Atkins, W., 2005. The chemistry and biology of inhibitors and pro-drugs targeted to glutathione S-transferases, *Cell Mol Life Sci*, 1221-1233.
- Maher, J., Slitt, A., Cherrington, N., Cheng, X., Klaassen, C., 2005. Tissue distribution and hepatic and renal ontogeny of the multidrug resistance-associated protein (Mrp) family in mice, *Drug Metab Dispos*, 947–55.
- Maiso, P., Carvajal-Vergara, X., Ocio, E., Lopez-Perez, R., Mateo, G., Gutierrez, N., vd., 2006. The histone deacetylase inhibitor LBH589 is a potent antimyeloma agent that overcomes drug resistance, *Cancer Res*, 5781-5789.
- Maki, C., Huibregtse, J., Howley, P., 1996. In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1), *Cancer Res*, 2649–2654.
- Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jensson, H., Tahir, M. K., Warholm, M., vd., 1985. Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties, *Proc Natl Acad Sci USA*, 7202-7206.
- Mao, Q., Deeley, R., Cole, S., 2000. Functional reconstitution of substrate transport by purified multidrug resistance protein MRP-1 (ABCC1) in phospholipid vesicles, *J Biol Chem*, 34166–72.
- Marchan, R., Hammond, C., Ballatori, N., 2008. Multidrug resistance associated protein 1 as a major mediator of basal and apoptotic glutathione release, *Biochim Biophys Acta*, 2413–2420.
- Marchetti, S., Mazzanti, R., Beijnen, J. H., Schellens, J. H., 2007. Concise review: clinical relevance of drug-drug and herb-drug interactions mediated by the ABC transporter ABCB1, *Oncologist*, 927-941.
- Markovina, S., Callander, N., O'Connor, S., Kim, J., Werndli, J., Raschko, M., vd., 2008. Bortezomib-resistant nuclear factor-kappaB activity in multiple myeloma cells, *Mol Cancer Res*, 1356–1364.
- Markovina, S., Callander, N., O'Connor, S., Xu, G., Shi, Y., Leith, C., vd., 2010. Bone marrow stromal cells from multiple myeloma patients uniquely induce bortezomib resistant NFkappaB activity in myeloma cells, *Mol Cancer*, 176.

- Masood, N., Malik, F., Kayani, M., 2011. Expression of xenobiotic metabolizing genes in head and neck cancer tissues, *Asian Pac J Cancer Prev*, 377–82.
- Matsui, W., Wang, Q., Barber, J., Brennan, S., Smith, B., Borrello, I., vd., 2008. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance, *Cancer Res*, 190-197.
- Mayor, T., 2011. Navigating the ERAD interaction network, *Nat Cell Biol*, 46–47.
- McConkey, D., Zhu, K., 2008. Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer, *Drug Resist Updates*, 164–179.
- McConkey, D., White, M., Yan, W., 2012. HDAC inhibitor modulation of proteotoxicity as a therapeutic approach in cancer, *Adv Cancer Res*, 131–163.
- Meads, M., Gatenby, R., Dalton, W., 2009. Environment mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease, *Nat Rev Cancer*, 665-674.
- Meister, A., Anderson, M., 1983. Glutathione, *Annu Rev Biochem*, 711-760.
- Meister, S., Schubert, U., Neubert, K., Herrmann, K., Burger, R., Gramatzki, M., vd., 2007. Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition, *Cancer Res*, 1783–1792.
- Merlo, L., Pepper, J., Reid, B., Maley, C., 2006. Cancer as an evolutionary and ecological process, *Nat Rev Cancer* 6, 924.
- Milani, M., Rzymiski, T., Mellor, H., Pike, L., Bottini, A., Generali, D., vd., 2009. The role of ATF4 stabilization and autophagy in resistance of breast cancer cells treated with Bortezomib, *Cancer Res*, 4415–4423.
- Miller, C., Ban, K., Dujka, M., McConkey, D., Munsell, M., Palladino, M., vd., 2007. NPI-0052, a novel proteasome inhibitor, induces caspase-8 and ROS-dependent apoptosis alone and in combination with HDAC inhibitors in leukemia cells, *Blood*, 267–277.
- Minderman, H., Zhou, Y., O'Loughlin, K., Baer, M., 2007. Bortezomib activity and in vitro interactions with anthracyclines and cytarabine in acute myeloid leukemia cells are independent of multidrug resistance mechanisms and p53 status, *Cancer Chemother Pharmacol*, 245–255.
- Mitchell, J., Russo, A., 1987. The role of glutathione in radiation and drug induced cytotoxicity, *BJ Cancer*, 96-104.
- Mitsiades, C., Mitsiades, N., Hideshima, T., Richardson, P., Anderson, K., 2005. Proteasome inhibitors as therapeutics, *Essays Biochem*, 205–218.
- Mitsiades, C., Treon, S., Mitsiades, N., Shima, Y., Richardson, P., Schlossman, R., vd., 2001. TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications, *Blood*, 795–804.

- Mitsiades, N., Mitsiades, C., Poulaki, V., Chauhan, D., Fanourakis, G., Gu, X., vd., 2002. Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 14374–14379.
- Miyoshito, T., Krojewski, S., Krowjewski, M., 1994. Tumor suppressor P53 is regulator of Bcl-2 and Bax gene expression in vitro and in vivo, *Oncogene*, 1799-1805.
- MMRF., 2015. Multiple Myeloma Disease Overview, California, Multiple Myeloma Research Foundation.
- Molineaux, S., 2012. Molecular pathways: targeting proteasomal protein degradation in cancer, *Clin Cancer Res*, 15–20.
- Moreau, P., Pylypenko, H., Grosicki, S., Karamanesht, I., Leleu, X., Grishunina, M., vd., 2011. Subcutaneous versus intravenous administration of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma: a randomised, phase 3, non-inferiority study, *Lancet Oncol*, 431–40.
- Moreau, P., Richardson, P., Cavo, M., Orlowski, R., San Miguel, J., Palumbo, A. vd., 2012. Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later, *Blood*, 947–959.
- Morrow, C. S., Peklak Scott, C., Bishwokarma, B., Kute, T. E., Smitherman, P. K., Townsend, A. J., 2006. Multidrug resistance protein 1 mediates resistance to mitoxantrone via glutathione dependent drug efflux, *Mol Pharmacol*, 1499-505.
- Morrow, C. S., Smitherman, P. D., Townsend, A. J., 1998. Combined expression of multidrug resistance protein (MRP) and glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) in MCF7 cells and high level resistance to the cytotoxicities of ethacrynic acid but not oxazaphosphorines or cisplatin, *Biochem Pharmacol*, 1013–1021.
- Muchamuel, T., Basler, M., Aujay, M., Suzuki, E., Kalim, K., Lauer, vd., 2009. A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis, *Nat Med*, 781–787.
- Muller, M., Meijer, C., Zaman, G., Borst, P., Scheper, R., Mulder, N., vd., 1994. Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport, *Proc Natl Acad Sci USA*, 13033-13037.
- Murata, S., Yashiroda, H., Tanaka, K., 2009. Molecular mechanisms of proteasome assembly, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 104–115.
- Nagata, Y., Anan, T., Yoshida, T., Mizukami, T., Taya, Y., Fujiwara, T., vd., 1999. The stabilizationn mechanism of mutant-type p53 by impaired ubiquitination: The loss of wild-type p53 function and the hsp90 association, *Oncogene*, 6037–49.

- Nakamura, T., Tanaka, K., Matsunobu, T., Okada, T., Nakatani, F., Sakimura, R., vd., 2007. The mechanism of cross-resistance to proteasome inhibitor bortezomib and overcoming resistance in Ewing's family tumor cells, *Int J Oncol*, 803–811.
- Nalepa, G., Rolfe, M., Wade Harper, J., 2006. Drug discovery in the ubiquitin–proteasome system, *Nat Rev Drug Discov*, 596–613.
- Nara, M., Teshima, K., Watanabe, A., Ito, M., Iwamoto, K., Kitabayashi, A., vd., 2013. Bortezomib Reduces the Tumorigenicity of Multiple Myeloma via Downregulation of Upregulated Targets in Clonogenic Side Population Cells, *Plos One*, 1-13.
- Naramoto, H., Uematsu, T., Uchihashi, T., Doto, R., Matsuura, T., Usui, Y. vd., 2007. Multidrug resistance-associated protein 7 expression is involved in cross-resistance to docetaxel in salivary gland adenocarcinoma cell lines, *Int J Oncol*, 393–401.
- Narasaki, F., Oka, M., Nakano, R., Ikeda, K., Fukuda, M., Nakamura, T., vd., 1997. Human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) is expressed in human lung, gastric, and colorectal cancer cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 606–11.
- Nathan, J., Spinnenhirn, V., Schmidtke, G., Basler, M., Groettrup, M., Goldberg, A. 2013. Immuno and constitutive proteasomes do not differ in their abilities to degrade ubiquitinated proteins, *Cell*, 1184–1194.
- Nathwani, N., Larsen, J., Kapoor, P., 2016. Consolidation and maintenance therapies for newly diagnosed multiple myeloma in the era of novel agents, *Curr Hematol Malig Rep*, 127–136.
- Naujokat, C., Hoffmann, S., 2002. Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis, *Lab Invest*, 965–980.
- Naujokat, C., Sezer, O., Zinke, H., Leclere, A., Hauptmann, S., Possinger, K., 2000. Proteasome inhibitors induced caspase-dependent apoptosis and accumulation of p21WAF1/Cip1 in human immature leukemic cells, *Eur J Haematol*, 221–236.
- Navon, A., Golberg, A., 2001. Proteins are unfolded on the surface of the ATPase ring before transport into the proteasome, *Mol Cell*, 1339–1349.
- Naymagon, L., Abdul-Hay, M., 2016. Novel agents in the treatment of multiple myeloma: A review about the future, *J Hematol Oncol*, 52–72.
- Nefedova, Y., Landowski, T., Dalton, W., 2003. Bone marrow stromal-derived soluble factors and direct cell contact contribute to de novo drug resistance of myeloma cells by distinct mechanisms, *Leukemia*, 1175-1182.
- Ni, H., Ergin, M., Huang, Q., Qin, J., Amin, H., Martinez, R., vd., 2001. Analysis of expression of nuclear factor kappa B (NF- κ B) in multiple myeloma: downregulation of NF- κ B induces apoptosis, *Br J Haematol*, 279–286.

- Nies, A., Keppler, D., 2007. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP-2), *Pflügers Arch*, 643–659.
- Nies, A., Jedlitschky, G., König, J., Herold Mende, C., Steiner, H., Schmitt, H., vd., 2004. Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP-1–MRP-6 (ABCC1–ABCC6), in human brain, *Neuroscience*, 349–360.
- Nies, A., König, J., Pfannschmidt, M., Klar, E., Hofmann, W., Keppler, D., 2001. Expression of the multidrug resistance proteins MRP-2 and MRP-3 in human hepatocellular carcinoma, *Int J Cancer*, 492–9.
- Nies, A., Schwab, M., Keppler, D., 2008. Interplay of conjugating enzymes with OATP uptake transporters and ABCC/MRP efflux pumps in the elimination of drugs, *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 545–568.
- Nies, A., Spring, H., Thon, W., Keppler, D., Jedlitschky, G., 2002. Immunolocalization of multidrug resistance protein 5 in the human genitourinary system, *J Urol*, 2271–2275.
- Niewerth, D., Franke, N., Jansen, G., Assaraf, Y., van Meerloo, J., Kirk, C., vd., 2013. Higher ratio immune vs. constitutive proteasome level as novel indicator of sensitivity of pediatric acute leukemia cells to proteasome inhibitors, *Haematologica*, 1896–1904.
- Niewerth, D., Jansen, G., Assaraf, Y., Zweegman, S., Kaspers, G., Cloos, J., 2015. Molecular basis of resistance to proteasome inhibitors in hematological malignancies, *Drug Resistance Updates*, 18–35.
- Niewerth, D., Jansen, G., Riethoff, L., van Meerloo, J., Kale, A., Moore, B., vd., 2014a. Antileukemic activity and mechanism of drug resistance to the marine *Salinispora tropica* proteasome inhibitor salinosporamide A (Marizomib), *Mol Pharmacol*, 12–19.
- Niewerth, D., Kaspers, G., Assaraf, Y., van Meerloo, J., Kirk, C., Anderl, J., vd., 2014b. Interferon- γ -induced upregulation of immunoproteasome subunit assembly overcomes bortezomib resistance in human hematological cell lines, *J Hematol Oncol*, 7.
- Niewerth, D., van Meerloo, J., Assaraf, Y., Jansen, G., Hendrickx, T., Kirk, C., vd., 2014c. Anti-leukemic activity and mechanisms underlying resistance to the novel immunoproteasome inhibitor PR-924, *Biochem Pharmacol*, 43–51.
- Nikesitch, N., Ling, S., 2016. Molecular mechanisms in multiple myeloma drug resistance, *J Clin Pathol*, 97–101.
- Nooter, K., Westerman, A., Flens, M., Zaman, G., Scheper, R., van Wingerden, K., vd., 1995. Expression of the multidrug resistance associated protein (MRP) gene in human cancers, *Clin Cancer*, 1301–1310.
- O'Brien, M., Tew, K., 1996. Glutathione and related enzymes in multidrug resistance, *Eur J Cancer*, 967–978.

- O'Connor, R., Ooi, M., Meiller, J., Jakubikova, J., Klippel, S., Delmore, J., vd., 2013. The interaction of bortezomib with multidrug transporters: implications for therapeutic applications in advanced multiple myeloma and other neoplasias, *Cancer Chemother Pharmacol*, 1357–1368.
- O'Neill, G., Peters, G., Harvie, R., MacKenzie, H., Henness, S., Davey, R., 1998. Amplification and expression of the ABC transporters ARA and MRP in a series of multidrug-resistant leukaemia cell sublines, *Br J Cancer*, 2076–80.
- Obeng, E., Carlson, L., Gutman, D., Harrington, W., Lee, K., Boise, L., 2006. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells, *Blood*, 4907–4916.
- Oerlemans, R., Franke, N., Assaraf, Y., Cloos, J., van Zantwijk, I., Berkers, C., vd., 2008. Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein, *Blood*, 2489–99.
- Ogata, A., Chauhan, D., Teoh, G., Treon, S., Urashima, M., Schlossman, R., vd., 1997. IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade, *J Immunol*, 2212–2221.
- Oguri, T., Isobe, T., Suzuki, T., Nishio, K., Fujiwara, Y., Katoh, O., vd., 2000. Increased expression of the MRP-5 gene is associated with exposure to platinum drugs in lung cancer, *Int J Cancer*, 95–100.
- Oguri, T., Ozasa, H., Uemura, T., Bessho, Y., Miyazaki, M., Maeno, K., vd., 2008. MRP-7/ABCC10 expression is a predictive biomarker for the resistance to paclitaxel in non-small cell lung cancer, *Mol Cancer Ther*, 1150–5.
- Ogus, H., Balk, M., Aksoy, Y., Muftuoglu, M., Ozer, N., 1998. The effects of oxidative stress on the redox system of the human erythrocyte, T. Özben vd. içinde, *Free Radicals, Oxidative Stress and Antioxidants: Pathological and Physiological Significance* 1st ed, NATO ASI Series A, Life Sciences (s. 25-37), New York, Plenum Press.
- Oh, S. J., Ryu, C. K., Choi, I., Baek, S. Y., Lee, H., 2012. Chemotherapeutic Candidate Inducing Immunological Death of Human Tumor Cell Lines, *Immune Network*, 66-69.
- Ohishi, Y., Oda, Y., Uchiumi, T., Kobayashi, H., Hirakawa, T., Miyamoto, S., vd., 2002. ATP-binding cassette superfamily transporter gene expression in human primary ovarian carcinoma, *Clin Cancer Res*, 3767–75.
- Ojeda, F., Diehl, H.A., Folch, H., 1994. Radiation induced membrane changes and programmed cell death: possible interrelationships. *Scanning Microsc*, 645-651.
- Ono, N., van der Heijden, I., Scheffer, G., van de Wetering, K., van Deemter, E., de Haas, M., vd., 2007. Multidrug resistance associated protein 9 (ABCC12) is present in mouse and boar sperm, *Biochem J*, 31–40.

- Orlowski, R., 2005. The ubiquitin proteasome pathway from bench to bedside, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 220–5.
- Orlowski, R., Stinchcombe, T., Mitchell, B., Shea, T., Baldwin, A., Stahl, S., vd., 2002. Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies, *J Clin Oncol*, 4420–4427.
- Öksüzöğlü, E., Kozalak, G., 2018. The relationship with apoptosis of bortezomib resistance in multiple myeloma cell lines, *Turkish J Biochemistry*, 29.
- Padowski, J. M., Pollack, G. M., 2010. Pharmogenetic and pharmacodynamic implications of P- glycoprotein modulation, *Methods Mol Biol*, 359-384.
- Pagano, M., Tam, S., Theodoras, A., Beer-Romero, P., Del Sal, G., Chau, V., vd., 1995. Role of the ubiquitin–proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27, *Science*, 682–685.
- Paiva, B., Martinez-Lopez, J., Vidriales, M., Mateos, M., Montalban, M., Fernandez-Redondo, E., vd., 2011. Comparison of immunofixation, serum free light chain, and immunophenotyping for response evaluation and prognostication in multiple myeloma, *J Clin Oncol*, 1627–1633.
- Pajeva, I., Globisch, C., Wiese, M., 2004. Structure-function relationships of multidrug resistance P-glycoprotein, *J Med Chem*, 2523-33.
- Palombella, V., Conner, E., Fuseler, J., Destree, A., Davis, J., Laroux, F., vd., 1998. Role of the proteasome and NF-kappaB in streptococcal cell wall-induced polyarthritis, *Proc Natl Acad Sci USA*, 15671–15676.
- Palombella, V., Rando, O., Goldberg, A., Maniatis, T., 1994. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B, *Cell*, 773–785.
- Panani, A., Ferti, A., Papaxoinis, C., Raptis, S., Roussos, C., 2004. Cytogenetic data as a prognostic factor in multiple myeloma patients: involvement of 1p12 region an adverse prognostic factor, *Anticancer Res*, 4141–6.
- Parlati, F., Lee, S., Aujay, M., Suzuki, E., Levitsky, K., Lorens, J., vd., 2009. Carfilzomib can inducetumor cell death through selective inhibition of the chymotrypsin-like activitactivity of the proteasome, *Blood*, 3439–3447.
- Pasqualetti, P., Casale, R., 1997. Risk of malignant transformation in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, *Biomed Pharmacother*, 74–78.
- Paulusma, C., Bosma, P., Zaman, G., Bakker, C., Otter, M., G.L., S., vd., 1996. Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene, *Science*, 1126-1128.
- Paulusma, C., Kool, M., Bosma, P., Scheffer, G., ter Borg, F., Scheper, R., vd., 1997. A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome, *Hepatology*, 1539-42.

- Pawagi, A., Wang, J., Silverman, M., Reithmeier, R., Deber, C., 1994. Transmembrane aromatic amino acid distribution in P-glycoprotein, A functional role in broad substrate specificity, *J Mol Biol*, 554-64.
- PDQ Adult Treatment Editorial Board., 2016. Plasma Cell Neoplasms (Including Multiple Myeloma) Treatment, PDQ Cancer Information Summaries, Bethesda (MD), National Cancer Institute (US).
- Peacock, C., Wang, Q., Gesell, G., Corcoran-Schwartz, I., Jones, E., Kim, J., vd., 2007. Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma, *Proc Natl Acad Sci USA*, 4048-4053.
- Pérez-Galán, P., Mora-Jensen, H., Weniger, M., Shaffer, A., Rizzatti, E., Chapman, C., vd., 2011. Bortezomib resistance in mantle cell lymphoma is associated with plasmacytic differentiation, *Blood*, 542–552.
- Perkins, N., 2007. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 49-62.
- Petrucci, M., Giraldo, P., Corradini, P., Teixeira, A., Dimopoulos, M., Blau, I., vd., 2013. A prospective, international phase 2 study of bortezomib retreatment in patients with relapsed multiple myeloma, *Br J Haematol*, 649–659.
- Plasschaert, S., de Bont, E., Boezen, M., vander Kolk, D., Daenen, S., Faber, K., vd., 2005. Expression of multidrug resistance-associated proteins predicts prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia, *Clin Cancer Res*, 8661–8.
- Pleban, E., Bury, M., Mlynarczuk, I., Wojcik, C., 2001. Effects of proteasome inhibitor PSI on neoplastic and non-transformed cell lines, *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, 133–4.
- Podar, K., Chauhan, D., Anderson, K., 2009. Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy, *Leukemia*, 10–24.
- Potts, B., Albitar, M., Anderson, K., Baritaki, S., Berkers, C., Bonavida, B., vd., 2011. Marizomib, a proteasome inhibitor for all seasons: preclinical profile and a framework for clinical trials, *Curr Cancer Drug Targets*, 254–284.
- Pratt, S., Shepard, R., Kandasamy, R., Johnston, P., Perry, W., Dantzig, A., 2005. The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5 fluorouracil and transports the monophosphorylated metabolites, *Mol Cancer Ther*, 855–863.
- Qazilbash, M., Saliba, R., Ahmed, B. vd., 2007. Deletion of the short arm of chromosome 1(del1p) is a strong predictor of poor outcome in myeloma patients under going an auto transplant, *Biol Blood Marrow Transpl*, 1066–1072.
- Qin, J., Yao, J., Cui, G., Xiao, H., Kim, T., Fraczek, J., vd., 2006. TLR8-mediated NF-kappaB and JNK activation are TAK1-independent and MEKK3-dependent, *J Biol Chem*, 21013-21.

- Quattrone, A., Papucci, L., Morganti, M., Coronello, M., Mini, E., Mazzei, T., vd., 1994. Inhibition of MDRf gene expression by antimessenger oligonucleotides lowers multiple drug resistance, *Oncol Res*, 311-320.
- Rajkumar, S., Dispenzieri, A., Kyle, R., 2006. Monoclonal gammopathy of undetermined significance, Waldenstrom macroglobulinemia, AL amyloidosis, and related plasma cell disorders: diagnosis and treatment, *Mayo Clin Proc*, 693–703.
- Rajkumar, S., Richardson, P., Hideshima, T., Anderson, K., 2005. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer, *J Clin Oncol*, 630–639.
- Rappa, G., Lorico, A., Flavell, R., Sartorelli, A., 1997. Evidence that the multidrug resistance protein (MRP) functions as a co-transporter of glutathione and natural product toxins, *Cancer Res*, 5232–7.
- Rashed, M., Ragap, N., 2004. The pattern of expression of the apoptotic inducer fas and the apoptotic inhibitor bcl-2 oncogenes immunohistochemically in bone-marrow invaded by the non-hodgkin lymphomas, *Turk J Haematol*, 141-147.
- Rawstron, A., Gregory, W., de Tute, R., Davies, F., Bell, S., Drayson, M., vd., 2015. Minimal residual disease in myeloma by flow cytometry: Independent prediction of survival benefit per log reduction, *Blood*, 1932–1935.
- Rea, P. A., Li, Z.-S., Lu, Y.-P., Drozdowicz, Y. M., Martinoia, E., 1998. From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 727–760.
- Reece, D., Song, K., Fu, T., Roland, B., Chang, H., Horsman, D., vd., 2009. Influence of cytogenetics in patients with relapsed or refractory multiple myeloma treated with lenalidomide plus dexamethasone: adverse effect of deletion 17p13, *Blood*, 522-525.
- Reeve, J., Rabbitts, P., Twentyman, P., 1989. Amplification and expression of mdrl gene in a multidrug resistant variant of small cell lung cancer cell line NCI H69, *Br J Cancer*, 339-342.
- Regev, R., Eytan, G., 1997. Flip-flop of doxorubicin across erythrocyte and lipid membranes, *Biochem Pharmacol*, 1151–8.
- Reid, G., Wielinga, P., Zelcer, N., De Haas, M., Van Deemter, L., Wijnholds, J., vd., 2003a. Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP-4 and MRP-5, *Mol Pharmacol*, 1094–103.
- Reid, G., Wielinga, P., Zelcer, N., van der Heijden, I., Kuil, A., de Haas, M., vd., 2003b. The human multidrug resistance protein MRP-4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs, *Proc Natl Acad Sci USA*, 9244–9249.

- Reits, E., Benham, A., Plougastel, B., Neefjes, J., Trowsdale, J., 1997. Dynamics of proteasome distribution in living cells, *EMBO J*, 6087–6094.
- Reits, E., Griekspoor, A., Neijssen, J., Groothuis, T., Jalink, K., van Veelen, P., vd., 2003. Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I, *Immunity*, 97–108.
- Renes, J., de Vries, E., Nienhuis, E., Jansen, P., Muller, M., 1999. ATP- and glutathione-dependent transport of chemotherapeutic drugs by the multidrug resistance protein MRP-1, *Br J Pharmacol*, 681–8.
- Ri, M., Iida, S., Nakashima, T., Miyazaki, H., Mori, F., Ito, A., vd., 2010. Bortezomib-resistant myeloma cell lines: a role for mutated PSMB5 in preventing the accumulation of unfolded proteins and fatal ER stress, *Leukemia*, 1506–1512.
- Ricci, G., De Maria, F., Antonini, G., Turella, P., Bullo, A., Stella, L. vd., 2005. 7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazole derivatives, a new class of suicide inhibitors for glutathione S-transferases: mechanism of action of potential anticancer drugs, *J Biol Chem*, 26397-405.
- Richardson, P., Barlogie, B., Berenson, J. S., Jagannath, S., Irwin, D., Rajkumar, S., vd., 2003. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma, *N Engl J Med*, 2609-2617.
- Richardson, P., Mitsiades, C., Laubach, J., Hajek, R., Spicka, I., Dimopoulos, M., vd., 2013. Preclinical data and early clinical experience supporting the use of histone deacetylase inhibitors in multiple myeloma, *Leuk Res*, 829-837.
- Richardson, P., Sonneveld, P., Schuster, M., Irwin, D., Stadtmauer, E., Facon, T., vd., 2005. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma, *N Engl J Med*, 2487–2498.
- Richardson, P., Spencer, A., Cannell, P., Harrison, S., Catley, L., Underhill, C., vd., 2011. Phase 1 Clinical Evaluation of Twice-Weekly Marizomib (NPI-0052), a Novel Proteasome Inhibitor, in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (MM), *Blood*, 302.
- Rius, M., Hummel-Eisenbeiss, J., Keppler, D., 2008. ATP-dependent transport of leukotrienes B4 and C4 by the multidrug resistance protein ABCC4 (MRP-4), *J Pharmacol Exp Ther*, 86–94.
- Rius, M., Thon, W., Keppler, D., Nies, A., 2005. Prostanoid transport by multidrug resistance protein 4 (MRP-4/ABCC4) localized in tissues of the human urogenital tract, *J Urol*, 2409–14.
- Robinson, A. H., 2004. Modelling and bioinformatics studies of the human Kappa-class glutathione transferase predict a novel third glutathione transferase family with similarity to prokaryotic 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerases, *Biochem J*, 541-552.

- Roccaro, A., Sacco, A., Aujay, M., Ngo, H., Azab, A., Azab, F., vd., 2010. Selective inhibition of chymotrypsin-like activity of the immunoproteasome and constitutive proteasome in Waldenstrom macroglobulinemia, *Blood*, 4051–4060.
- Rock, K., Goldberg, A., 1999. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides, *Annu Rev Immunol*, 739–779.
- Rock, K., York, I., Saric, T., Goldberg, A., 2002. Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides, *Adv Immunol*, 1–70.
- Rothnie, A., Callaghan, R., Deeley, R., Cole, S., 2006. Role of GSH in estrone sulfate binding and translocation by the multidrug resistance protein 1 (MRP-1, ABCC1), *J Biol Chem*, 13906–13914.
- Ruckrich, T., Kraus, M., Gogel, J., Beck, A., Ovaa, H., Verdoes, M., vd., 2009. Characterization of the ubiquitin–proteasome system in bortezomib-adapted cells, *Leukemia*, 1098–1105.
- Rumpold, H., Salvador, C., Wolf, A. M., Tilg, H., Gastl, G., Wolf, D., 2007. Knockdown of P-gp resensitizes leukemic cells to proteasome inhibitors. *Biochem and Biophys Res Comm*, 549–554.
- Russel, F., Koenderink, J., Masereeuw, R., 2008. Multidrug resistance protein 4 (MRP-4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules, *Trends Pharmacol Sci*, 200–207.
- Ryu, S., Kawabe, T., Nada, S., Yamaguchi, A., 2000. Identification of basic residues involved in drug export function of human multidrug resistance associated protein 2, *J Biol Chem*, 39617–39624.
- Sadava, D., Hamman, W., 2007. RNA Interference against MDR1 but not MRP-1 Reverses, *J Cancer Mol*, 91-94.
- Saha, M., Jiang, H., Jayakar, J., Reece, D., Branch, D., Chang, H., 2010. MDM2 antagonist nutlin plus proteasome inhibitor velcade combination displays a synergistic anti-myeloma activity, *Cancer Biol Ther*, 936-944.
- Saha, M., Jiang, H., Yang, Y., Zhu, X., Wang, X., Schimmer, A., vd., 2012. Targeting p53 via JNK pathway: a novel role of RITA for apoptotic signaling in multiple myeloma, *Plos One*, e30215.
- Salvat, C., Jariel-Encontre, I., Acquaviva, C., Omura, S., Piechaczyk, M., 1998. Differential directing of c-Fos and c-Jun proteins to the proteasome in serum-stimulated mouse embryo fibroblasts, *Oncogene*, 327–337.
- Samuelsson, B., Dahlen, S., Lindgren, J., Rouzer, C., Serhan, C., 1987. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects, *Science*, 1171–6.
- San Miguel, J., Schlag, R., Khuageva, N., Dimopoulos, M., Shpilberg, O., Kropff, M., vd., 2008. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma, *N Engl J Med*, 906-917.

- Sandor, V., Fojo, T., Bates, S., 1998. Future perspectives for the development of P-glycoprotein modulators, *Drug Resist Updates*, 190–200.
- Sandusky, G., Mintze, K., Pratt, S., Dantzig, A., 2002. Expression of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP-2) in normal human tissues and carcinomas using tissue microarrays, *Histopathology*, 65–74.
- San-Miguel, J., Mateos, M., 2011. Can multiple myeloma become a curable disease?, *Haematologica*, 1246–1248.
- Santra, M., Zhan, F., Tian, E. vd., 2003. A subset of multiple myeloma harboring the t(4;14)(p16;q32) translocation lacks FGFR3 expression but maintains anIGH/MMSET fusion transcript, *Blood*, 2374–2376.
- Saraswathy, M., Gong, S., 2013. Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer, *Biotechnology Advances*, 1397–1407.
- Sarkadi, B., Homolya, L., Szakács, G., Váradi, A., 2006. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system, *Physiol Rev*, 1179–236.
- Sasaki, C., Barberi, T., Ghosh, P., Longo, D., 2005. Phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 defines an I{ κ }B{ α }-independent NF- κ B pathway, *J Biol Chem*, 34538–47.
- Sassi, Y., Lipskaia, L., Vandecasteele, G., Nikolaev, V., Hatem, S., Cohen Aubart, F., vd., 2008. Multidrug resistance associated protein 4 regulates cAMP dependent signalling pathways and controls human and rat SMC proliferation, *J Clin Invest*, 2747–2757.
- Sau, A., Pellizzari Tregno, F., Valentino, F., Federici, G., Caccuri, A., 2010. Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance, *Arc Biochem Biophys*, 116–22.
- Sawyer, J., 2011. The prognostic significance of cytogenetics and molecular profiling in multiple myeloma, *Cancer Genet*, 3–12.
- Sawyer, J., Waldron, J., Jagannath, S., Barlogie, B., 1995. Cytogenetic findings in 200 patients with multiple myeloma. *Cancer Genet, Cytogenet*, 41–49.
- Schaub, T., Ishikawa, T., Keppler, D., 1991. ATP-dependent leukotriene export from mastocytoma cells, *FEBS Lett*, 83–6.
- Schaub, T., Kartenbeck, J., König, J., Vogel, O., Witzgall, R., Kriz, W., vd., 1997. Expression of the conjugate export pump encoded by the MRP-2 gene in the apical membrane of kidney proximal tubules, *J Am Soc Nephrol*, 1213–21.
- Scheffer, G., Hu, X., Pijnenborg, A., Wijnholds, J., Bergen, A., Scheper, R., 2002b. MRP-6 (ABCC6) detection in normal human tissues and tumors, *Lab Invest*, 515–8.

- Scheffer, G., Kool, M., de Haas, M., de Vree, J., Pijnenborg, A., Bosman, D., vd., 2002a. Tissue distribution and induction of human multidrug resistant protein 3, *Lab Invest*, 193–201.
- Schinkel, A., Jonker, J., 2003. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 3–29.
- Schinkel, A., Smit, J., van Tellingen, O., Beijnen, J., Wagenaar, E., van Deemter, L., vd., 1994. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs, *Cell*, 491–502.
- Schmidmaier, R., Morsdorf, K., Baumann, P., Emmerich, B., Meinhardt, G., 2006. Evidence for cell adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma cells in vivo, *Int J Biol Markers*, 218–222.
- Schmitt, S., Deshmukh, R., Dou, Q., 2014. Proteasome inhibitors and lessons learned from their mechanisms of action and resistance in human cancer, Q. Dou içinde, *Resistance to Proteasome Inhibitors in Cancer* (1–46), Switzerland, Springer International Publishing.
- Schubert, U., Antón, L., Gibbs, J., Norbury, C., Yewdell, J., Bennink, J., 2000. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes, *Nature*, 770–774.
- Schuetz, J., Connelly, M., Sun, D., Paibir, S., Flynn, P., Srinivas, R., vd., 1999. MRP-4: a previously unidentified factor in resistance to nucleoside based antiviral drugs, *Nat Med*, 1048–1051.
- Schwarzenbach, H., 2002. Expression of MDR1/P-Glycoprotein, the Multidrug Resistance Protein MRP, and the Lung-Resistance Protein LRP in Multiple Myeloma, *Medical Oncology*, 87–104.
- Seelig, A., Landwojtowicz, E., 2000. Structure–activity relationship of P-glycoprotein substrates and modifiers, *Eur J Pharm Sci*, 31–40.
- Shaffer, B. C., Gillet, J. P., Patel, C., Baer, M. R., Bates, S. E., Gottesman, M. M., 2012. Drug resistance still a daunting challenge to the successful treatment of AML, *Drug Resist Update*, 62–69.
- Shah, J., Orlowski, R., 2009. Proteasome inhibitors in the treatment of multiple myeloma, *Leukemia*, 1964–79.
- Shain, K., Dalton, W., 2001. Cell adhesion is a key determinant in de novo multidrug resistance (MDR): new targets for the prevention of acquired MDR, *Mol Cancer Ther*, 69–78.
- Shain, K., Yarde, D., Meads, M., Huang, M., Jove, R., Hazlehurst, L., vd., 2009. Beta1 integrin adhesion enhances IL-6-mediated STAT3 signaling in myeloma cells: implications for microenvironment influence on tumor survival and proliferation, *Cancer Res*, 1009–1015.

- Shammas, M., Shmookler Reis, R., Koley, H., Batchu, R., Li, C., Munshi, N., 2009. Dysfunctional homologous recombination mediates genomic instability and progression in myeloma, *Blood*, 2290-2297.
- Shimizu, H., Taniguchi, H., Hippo, Y., Hayashizaki, Y., Aburatani, H., Ishikawa, T., 2003. Characterization of the mouse *Abcc12* gene and its transcript encoding an ATP-binding cassette transporter, an orthologue of human ABCC12, *Gene*, 17–28.
- Shukla, S., Ohnuma, S., Ambudkar, S. V., 2011. Improving cancer chemotherapy with modulators of ABC drug transporters, *Curr Drug Targets*, 621-630.
- Siegel, D., Martin, T., Wang, M., Vij, R., Jakubowiak, A., Lonial, S., vd., 2012. A phase 2 study of single-agent carfilzomib (PX-171-003-A1) in patients with relapsed and refractory multiple myeloma, *Blood*, 2817–2825.
- Sies, H., 1988. Intracellular effects of glutathione conjugates and their transport from the cell, H. Sies, B. E. Ketterer içinde, *Glutathione conjugation: mechanisms and biological significance* (175–192), London, Academic Press.
- Sies, H., Summer, K., 1975. Hydroperoxide-metabolizing systems in rat liver, *Eur J Biochem*, 503–512.
- Sikic, B., 1997. Pharmacologic approaches to reversing multidrug resistance, *Semin Hematol*, 40–7.
- Singh, A., Bandi, M., Aujay, M., Kirk, C., Hark, D., Raje, N., vd., 2011. PR-924, a selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP-7, blocks multiple myeloma cell growth both in vitro and in vivo, *Br J Haematol*, 155–163.
- Sirohi, B., Powles, R., 2004. Multiple myeloma, *The Lancet*, 875–87.
- Sirohi, B., Powles, R., Mehta, J., Raje, N., Kulkarni, S., Ramiah, V., vd., 1999. Complete remission rate and outcome after intensive treatment of 177 patients under 75 years of age with IgG myeloma defining a circumscribed disease entity with a new staging system, *Br J Haematol*, 656–66.
- Sirohi, B., Powles, R., Mehta, J., Rudin, C., Kulkarni, S., Horton, C., vd., 2005. An elective single autograft with high-dose melphalan: Single-center study of 451 patients, *Bone Marrow Transplantation*, 19-24.
- Slot, A., Molinski, S., Cole, S., 2011. Mammalian multidrug-resistance proteins (MRPs), *Essays Biochem*, 179-207.
- Smadja, N., Bastard, C., Brigaudeau, C., vd., 2001. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma, *Blood*, 2229–2238.
- Smadja, N., Fruchart, C., Isnard, F. vd., 1998. Chromosomal analysis in multiple myeloma: cytogenetic evidence of two different diseases, *Leukemia*, 960–969.
- Smadja, N., Louvet, C., Isnard, F., vd., 1995. Cytogenetic study in multiple myeloma at diagnosis: comparison of two techniques, *Br J Haematol*, 619–624.

- Smith, D., Daniel, K. G., Dou, Q. P., 2005. Exploiting the ubiquitin–proteasome pathway for anticancer drug discovery: unanswered questions and future directions, *Lett Drug Des Discov*, 74–81.
- Smith, E., Boyd, K., Davies, F., 2010. The potential role of epigenetic therapy in multiple myeloma, *Br J Haematol*, 702-713.
- Solay, E., Droin, N., Bettaieb, A., vd., 2000. Positive and negative regulation of apoptotic pathways by cytotoxic agents in hematological malignancies, *Leukemia*, 1833-1849.
- Song, I. S., Jeong, Y. J., Jeong, S. H., Heo, H. J., Kim, H. K., Lee, S. R., vd., 2013a. Combination treatment with 2-methoxyestradiol overcomes bortezomib resistance of multiple myeloma cells, *Experimental Molecular Medicine*, 1-9.
- Song, I. S., Jeong, Y. J., Nyamaa, B., Jeong, S. H., Kim, H. K., Kim, N., vd., 2015. KSP inhibitor SB743921 induces death of multiple myeloma cells via inhibition of the NF-KB signaling pathway, *BMB Reports*, 571-576.
- Song, I., Kim, H., Lee, S., Jeong, S., Kim, N., Ko, K., vd., 2013b. Mitochondrial modulation decreases the bortezomib-resistance in multiple myeloma cells, *International Journal of Cancer*, 1357–1368.
- Sonneveld, P., 2000. Multidrug resistance in haematological malignancies, *Journal of Internal Medicine*, 521-534.
- Sonneveld, P., Avet-Loiseau, H., Lonial, S., Usmani, S., Siegel, D., Anderson, K., vd., 2016. Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: A consensus of the international myeloma working group, *Blood*, 2955–2962.
- Sonneveld, P., De Schoester, M., Leeuw, K., 1994. Clinical modulation of multidrug resistance in multiple myeloma, *Journal of Clinical Oncology*, 1584-91.
- Soriano, G., Besse, L., Li, N., Kraus, M., Besse, A., Meeuwenoord, N., vd., 2016. Proteasome inhibitor-adapted myeloma cells are largely independent from proteasome activity and show complex proteomic changes, in particular in redox and energy metabolism, *Leukemia*, 2198-2207.
- Soroka, C., Lee, J., Azzaroli, F., Boyer, J., 2001. Cellular localization and up-regulation of multidrug resistance-associated protein 3 in hepatocytes and cholangiocytes during obstructive cholestasis in rat liver, *Hepatology*, 783–91.
- Spets, H., Stromberg, T., Georgii-Hemming, P., Siljason, J., Nilsson, K., Jernberg-Wiklund, H., 2002. Expression of the bcl-2 family of pro- and anti-apoptotic genes in multiple myeloma and normal plasma cells: regulation during interleukin-6 (IL-6)-induced growth and survival, *Eur J Haematol*, 76–89.
- Sprynski, A., Hose, D., Caillot, L., Re, T., Jr, J., Barlogie, B., vd, 2009. The role of IGF-1 as a major growth factor for myeloma cell lines and the prognostic relevance of the expression of its receptor, *Lymphoid Neoplasia*, 4614–4626.

- Starheim, K., Holien, T., Misund, K., Johansson, I., Baranowska, K., Sponaas, A., vd., 2016. Intracellular glutathione determines bortezomib cytotoxicity in multiple myeloma cells, *Blood Cancer J*, 1-8.
- Stavrovskaya, A. A., Stromskaya, T. P., 2008. Transport proteins of the ABC family and multidrug resistance of tumor cells, *Biochemistry*, 592-604.
- Stein, W., 1997. Kinetics of the multidrug transporter (P-glycoprotein) and its reversal, *Physiol Rev*, 545–590.
- Stella, F., Weich, N., Panero, J., Fantl, D. B., Schutz, N., Fundia, A. F., vd., 2013. Glutathione S-transferase P1 mRNA expression in plasma cell disorders and its correlation with polymorphic variants and clinical outcome, *Cancer Epidemiology*, 671–674.
- Stewart, A., Bergsagel, P., Greipp, P., Dispenzieri, A., Gertz, M., Hayman, S., vd., 2007. A practical guide to defining high-risk myeloma for clinical trials, patient counseling and choice of therapy, *Leukemia*, 529–34.
- Stewart, A., Canitrot, Y., Baracchini, E., Dean, N., Deeley, R. C., 1996. Reduction in the expression of the multidrug resistance protein, MRP, in human tumour cells by antisense phosphorothioate oligonucleotides, *Biochem Pharmacol*, 461-469.
- Stoddard, E., Killinger, B., Nair, R., Sadler, N., Volk, R., Purvine, S., vd., 2017. Activity-Based Probes for Isoenzyme- and Site-Specific Functional Characterization of Glutathione S-Transferases, *J Am Chem Soc*, 16032–16035.
- Sudakin, V., Ganoth, D., Dahan, A., Heller, H., Hershko, J., Luca, F., vd., 1995. The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis, *Mol Biol Cell*, 185–197.
- Suzuki, E., Demo, S., Deu, E., Keats, J., Rastu-Kapur, S., Bergsagel, P., vd., 2011. Molecular mechanisms of bortezomib resistant adenocarcinoma cells, *Plos One*, e27996.
- Szakács, G., Paterson, J., Ludwig, J., Booth-Genthe, C., Gottesman, M., 2006. Targeting multidrug resistance in cancer, *Nat Rev Drug Discov*, 219-34.
- Szakacs, G., Varadi, A., Özvegy-Laczka, C., Sarkadi, B., 2008. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME–Tox), *Drug Discovery Today*, 379-393.
- Tagliaferri, P., Rossi, M., di Martino, M., Amodio, N., Leone, E., Gulla, A., vd., 2012. Promises and challenges of microRNA-based treatment of multiple myeloma, *Curr Cancer Drug Targets*, 838–846.
- Takano, M., Yumoto, R., Murakami, T., 2006. Expression and function of efflux drug transporters in the intestine, *Pharmacol Ther*, 137-161.

- Tammur, J., Prades, C., Arnould, I., Rzhetsky, A., Hutchinson, A., Adachi, M., vd., 2001. Two new genes from the human ATP binding cassette transporter superfamily, ABCC11 and ABCC12, tandemly duplicated on chromosome 16q12, *Gene*, 89–96.
- Tan, D., Gerlinger, M., Teh, B., Swanton, C., 2010. Anti-cancer drug resistance: understanding the mechanisms through the use of integrative genomics and functional RNA interference, *Eur J Cancer*, 2166-2177.
- Taniguchi, K., Wada, M., Kohno, K., Nakamura, T., Kawabe, T., Kawakami, M., vd., 1996. A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation, *Cancer Res*, 4124-9.
- Tchernev, G., 2009. Apoptotic pathways, cell cycle regulation and cancer progression: review, *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 952-8.
- Teicher, B., Ara, G., Herbst, R., Palombella, V., Adams, J., 1999. The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy, *Clin Cancer Res*, 2638–2645.
- Tew, K., 1994. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance, *Cancer Res*, 4313-4320.
- Tew, K., Dutta, S., Schultz, M., 1997. Inhibitors of glutathione S-transferases as therapeutic agents, *Adv Drug Deliv Rev*, 91-104.
- Tew, K., Monks, A., Barone, L., Rosser, D., Akerman, G., Montali, J. vd., 1996. Glutathione associated enzymes in the human cell lines of the National Cancer Institute Drug Screening Program, *Mol Pharmacol*, 149-59.
- Thompson, C., 1995. Apoptosis in the pathogenesis of autoimmune disease, *Clin Immunol Immunopathol*, 1456-1462.
- Tomida, A., Tsuruo, T., 2001. Drug resistance pathways as targets, B. Baguley, K. D.J.(eds.) içinde, *Anticancer Drug Development* (s. 77–90), San Diego, Academic Press.
- Tornatore, L., Sandomenico, A., Raimondo, D., Low, C., Rocci, A., Tralau-Stewart, C. vd., 2014. Cancer-selective targeting of the NF-kappaB survival pathway with GADD45beta/MKK7 inhibitors, *Cancer Cell*, 495–508.
- Townsend, D., Tew, K., 2003. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance, *Oncogene*, 7369-7375.
- Toyoda, Y., Sakurai, A., Mitani, Y., Nakashima, M., Yoshiura, K., Nakagawa, H., vd., 2009. Earwax, osmidrosis, and breast cancer: why does one SNP (538G>A) in the human ABC transporter ABCC11 gene determine earwax type?, *FASEB J*, 2001–2013.
- Tricot, G., Barlogie, B., Jagannath, S. vd., 1995. Poor prognosis in multiple myeloma is associated only with partial or complete deletions of

chromosome13 or abnormalities involving 11q and not with other karyotype abnormalities, *Blood*, 4250–4256.

Tricot, G., Sawyer, J., Jagannath, S. vd., 1997. Unique role of cytogenetics in the prognosis of patients with myeloma receiving high-dose therapy and auto transplants, *J Clin Oncol*, 2659–2666.

Turella, P., Cerella, C., Filomeni, G., Bullo, A., De Maria, F., Ghibelli, L., vd., 2005. Proapoptotic activity of new glutathione S-transferase inhibitors, *Cancer Res*, 3751-61.

Uitto, J., Li, Q., Jiang, Q., 2010. Pseudoxanthoma elasticum: molecular genetics and putative pathomechanisms, *J Invest Dermatol*, 661–670.

Ullah, M. F., 2008. Cancer Multidrug Resistance (MDR): A Major Impediment to Effective Chemotherapy, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 1-6.

Vaalburg, W., Hendrikse, N. H., Elsinga, P. H., Bart, J., van Waarde, A., 2005. P-glycoprotein activity and biological response, *Toxicol Appl Pharmacol*, 257-260.

van Aubel, R., Smeets, P., Peters, J., Bindels, R., Russel, F., 2002. The MRP-4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP, *J Am Soc Nephrol*, 595–603.

van der Kolk, D., de Vries, E., Koning, J., van den Berg, E., Muller, M., Vellenga, E., 1998. Activity and expression of the multidrug resistance proteins MRP-1 and MRP-2 in acute myeloid leukemia cells, tumor cell lines, and normal hematopoietic CD34+ peripheral blood cells, *Clin Cancer Res*, 1727–36.

van Deventer, S., Neefjes, J., 2010. The immunoproteasome cleans up after inflammation, *Cell*, 517–518.

Verbrugge, S. E., Assaraf, Y. G., Dijkmans, B. A., Scheffer, G. L., Al, M., den Uyl, D., vd., 2012. Inactivating PSMB5 Mutations and P-Glycoprotein Mediate Resistance to Proteasome Inhibitors: Ex Vivo Efficacy of (Immuno)Proteasome Inhibitors in Mononuclear Blood Cells from Patients with Rheumatoid Arthritis, *JPET*, 174–182.

Verbrugge, S., Al, M., Assaraf, Y., Niewerth, D., van Meerloo, J., Cloos, J., vd., 2013. Overcoming bortezomib resistance in human B cells by anti-CD20/rituximab-mediated complement-dependent cytotoxicity and epoxyketone-based irreversible proteasome inhibitors, *Exp Hematol Oncol*, 2.

Vergani, P., Lockless, S., Nairn, A., Gadsby, D., 2005. CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains, *Nature*, 876–880.

Versantvoort, C., Broxterman, H., Bagrij, T., Scheper, R., Twentyman, P., 1995. Regulation by glutathione of drug transport in multidrug-resistant human lung

- tumour cell lines overexpressing multidrug resistance-associated protein, *Br J Cancer*, 82–9.
- Versantvoort, C., Broxterman, H., Lankelma, J., Feller, N., Pinedo, H., 1994. Competitive inhibition by genistein and ATP dependence of daunorubicin transport in intact MRP overexpressing human small cell lung cancer cells, *Biochem Pharmacol*, 1129–1136.
- Versantvoort, C., Schuurhuis, G., Pinedo, H., Eekman, C., Kuiper, C., Lankelma, J., vd., 1993. Genistein modulates the decreased drug accumulation in non-P-glycoprotein mediated multidrug resistant tumour cells, *Br J Cancer*, 939–46.
- Vigneron, N., Van den Eynde, B., 2012. Proteasome subtypes and the processing of tumor antigens: increasing antigenic diversity, *Curr Opin Hematol*, 84–91.
- Voges, D., Zwickl, P., Baumeister, W., 1999. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis, *Annu Rev Biochem*, 1015–1068.
- Voorhees, P., Orlowski, R., 2006. The proteasome and proteasome inhibitors in cancer therapy, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 189–213.
- Wahllander, A., Sies, H., 1979. Glutathione S-conjugate formation from 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and biliary S-conjugate excretion in the perfused rat liver, *Eur J Biochem*, 441–446.
- Wallstab, A., Koester, M., Bohme, M., Keppler, D., 1999. Selective inhibition of MDR1 P-glycoprotein-mediated transport by the acridone carboxamide derivative GG918, *Br J Cancer*, 1053–60.
- Walter, P., Ron, D., 2011. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation, *Science*, 1081–1086.
- Wang, C., Mayo, M., Korneluk, R., Goeddel, D., Baldwin, J., 1998. NF- κ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation, *Science*, 1680–1683.
- Wang, J., Hendrix, A., Hernot, S., Lemaire, M., De Bruyne, E., Van Valckenborgh, E., vd., 2014. Bone marrow stromal cell-derived exosomes as communicators in drug resistance in multiple myeloma cells, *Blood*, 555–566.
- Wang, L., Kumar, S., Fridley, B., Kalari, K., Moon, I., Pelleymounter, L., vd., 2008. Proteasome B subunit pharmacogenomics: gene resequencing and functional genomics, *Clin Cancer Res*, 3503–3513.
- Wang, C. Y., Mayo, M. W., Baldwin, A. S., 1996. TNF- α and cancer therapy-induced cell death, *Science*, 274; 784–787.
- Wang, T., Arifoglu, P., Ronai, Z., Tew, K., 2001. Glutathione-S-transferase P1-1 (GSTP1-1) inhibits c-Jun N-terminal kinase (JNK1) signaling through interaction with the c terminus, *J Biol Chem*, 20999–1003.

- Wang, X., Luo, H., Chen, H., Duguid, W., Wu, J., 1998. Role of proteasomes in T cell activation and proliferation, *J Immunol*, 788–801.
- Waxman, D., 1990. Glutathione S-transferase: role in alkylating agent resistance and possible target for modulation chemotherapy-a review, *Cancer Res*, 6449-6454.
- Weinberg, F., Chandel, N., 2009. Mitochondrial metabolism and cancer, *Hypoxia and consequences*, *Ann N Y Acad Sci*, 1177, 66.
- Weissman, I., Shizuru, J., 2008. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases, *Blood*, 3543-53.
- Wester, R., Sonneveld, P., 2016. Innovations in treatment and response evaluation in multiple myeloma, *Haematologica*, 518–520.
- White, E., Di Paola, R., 2009. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer, *Clin Cancer Res*, 5308–5316.
- Wiberg, K., Carlson, K., Aleskog, A., Larsson, R., Nygren, P., Lindhagen, E., 2009. In vitro activity of bortezomib in cultures of patient tumour cells-potential utility in haematological malignancies, *Med Oncol*, 193–201.
- Wielinga, P., Hooijberg, J., Gunnarsdottir, S., Kathmann, I., Reid, G., Zelcer, N., vd., 2005. The human multidrug resistance protein MRP-5 transports folates and can mediate cellular resistance against antifolates, *Cancer Res*, 4425–4430.
- Wielinga, P., Reid, G., Challa, E., van der Heijden, I., van Deemter, L., de Haas, M., vd., 2002. Thiopurine metabolism and identification of the thiopurine metabolites transported by MRP-4 and MRP-5 overexpressed in human embryonic kidney cells, *Mol Pharmacol*, 1321–31.
- Wiernik, P. H., 2006. Plasma cell dyscrasias and leukemias, *Update on Cancer Therapeutics* 1, 539–567.
- Wijnholds, J., deLange, E., Scheffer, G., van den Berg, D., Mol, C., van der Valk, M. vd., 2000b. Multidrug resistance protein 1 protects the choroid plexus epithelium and contributes to the blood-cerebrospinal fluid barrier, *J Clin Invest*, 279–85.
- Wijnholds, J., Evers, R., van Leusden, M., Mol, C., Zaman, G., Mayer, U. vd., 1997. Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein, *Nat Med*, 1275–9.
- Wijnholds, J., Mol, C., van Deemter, L., de Haas, M., Scheffer, G., Baas, F. vd., 2000a. Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs, *Proc Natl Acad Sci USA*, 7476–81.
- Wijnholds, J., Scheffer, G., van der Valk, M., van der Valk, P., Beijnen, J., Scheper, R., vd., 1998. Multidrug resistance protein 1 protects the oropharyngeal

- mucosal layer and the testicular tubules against drug-induced damage, *J Exp Med*, 797–808.
- Wolf, D., Hilt, W., 2004. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal, *Biochim Biophys Acta*, 19–31.
- Wright, J. J., 2010. Combination Therapy of Bortezomib with Novel Targeted Agents: An Emerging Treatment Strategy, *Clin Cancer Res*, 4094-4104.
- Wu, Q., Yang, Z., Nie, Y., Shi, Y., Fan, D., 2014. Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: Mechanisms and lab approaches, *Cancer Letters*, 159-166.
- Wu, C., Woodcock, H., Hladky, S., Barrand, M., 2005. cGMP (guanosine 3',5'-cyclic monophosphate) transport across human erythrocyte membranes, *Biochem Pharmacol*, 1257–62.
- Wu, Z., Li, X., Zeng, Y., Zhuang, X., Shen, H., Zhu, H., vd, 2011. In vitro and in vivo inhibition of MRP gene expression and reversal of multidrug resistance by siRNA, *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 177-84.
- Wyler, B., Shao, Y., Schneider, E., Cianfriglia, M., Scheper, R. J., Frey, B. M., vd., 1997. Intermittent exposure to doxorubicin in vitro selects for multifactorial non-P-glycoprotein associated multidrug resistance in RPMI8226 human myeloma cells, *British Journal of Haematology*, 65-75.
- Xia, X., Jin-Long, Y., De-Qing, S., Wen, Z., Feng, K., Jing, W., vd., 2013. Curcumin as a multidrug resistance modulator-A quick review, *Biomedicine Preventive Nutrition*, 173-176.
- Xie, T., Geng, J., Wang, Y., Wang, L., Huang, M., Chen, J., vd., 2017. FOXM1 evokes 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer depending on ABCC10, *Oncotarget*, 8574-8589.
- Xie, Y., Varshavsky, A., 2000. Physical association of ubiquitin ligases and the 26S proteasome, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2497–2502.
- Xiong, W., Wu, X., Starnes, S., Johnson, S., Haessler, J., Wang, S., vd., 2008. An analysis of the clinical and biologic significance of P53 loss and the identification of potential novel transcriptional targets of P53 in multiple myeloma, *Blood*, 4235-4246.
- Yabuuchi, H., Shimizu, H., Takayanagi, S., Ishikawa, T., 2001. Multiple splicing variants of two new human ATP binding cassette transporters, ABCC11 and ABCC12, *Biochem Biophys Res Commun*, 933–939.
- Yague, E., Arance, A., Kubitza, L., O'Hare, M., Jat, P., Oglilvie, C. M., 2007. Ability to acquire drug resistance arises early during the tumorigenesis process, *Cancer Res*, 1130-7.
- Yamane, Y., Furuichi, M., Song, R., Van, N. T., Mulcahy, R. T., Ishikawa, T., vd., 1998. Expression of multidrug resistance protein/GS-X pump and gamma-

- glutamylcysteine synthetase genes is regulated by oxidative stress, *J Biol Chem*, 31075–31085.
- Yang, H., Ma, M., Vescio, R., Berenson, J., 2003. Overcoming drug resistance in multiple myeloma: the emergence of therapeutic approaches to induce apoptosis, *J Clin Oncol*, 4239-4247.
- Yang, P., Ebbert, J., Sun, Z., Weinshilboum, R., 2006. Role of glutathione metabolic pathway in lung cancer treatment and prognosis: A review, *J of Clin Oncology*, 1761-1769.
- Yang, Y., Chen, Y., Saha, M., Chen, J., Evans, K., Qiu, L., vd., 2014. Targeting phospho-MARCKS overcomes drug resistance and induces antitumor activity in preclinical models of Multiple Myeloma, *Leukemia*, 1–33.
- Yang, Y., Shi, J., Tolomelli, G., Xu, H., Xia, J., Wang, H., vd., 2013. RARa2 expression confers myeloma stem cell features, *Blood*, 1437-1447.
- Yao, J., Kim, T., Qin, J., Jiang, Z., Qian, Y., Xiao, H., vd., 2007, Interleukin-1 (IL-1)-induced TAK1-dependent Versus MEKK3-dependent NFkappaB activation pathways bifurcate at IL-1 receptor-associated kinase modification, *J Biol Chem*, 6075-89.
- Yeh, G. C., Lopaczynska, J., Poore, C., Phang, J., 1992. A new functional role for P-glycoprotein: efflux pump for benzo(a)pyrene in human breast cancer MCF-7 cells, *Cancer Res*, 6692–6695 .
- Yewdell, J., Nicchitta, C., 2006. The DRiP hypothesis decennial: support, controversy, refinement and extension, *Trends Immunol*, 368–373.
- Yoshida, M., Suzuki, T., Komiya, T., Hatashita, E., Nishio, K., Kazuhiko, N., vd., 2001. Induction of MRP-5 and SMRP mRNA by adriamycin exposure and its overexpression in human lung cancer cells resistant to adriamycin, *Int J Cancer*, 432–7.
- Yoshiura, K., Kinoshita, A., Ishida, T., Ninokata, A., Ishikawa, T., Kaname, T., vd., 2006. A SNP in the ABCC11 gene is the determinant of human earwax type, *Nat Genet*, 324–30.
- Yuan, H., Li, X., Wu, J. L., Qu, X., Xu, W., Tang, W., 2008. Strategies to overcome or circumvent P-glycoprotein mediated multidrug resistance, *Curr Med Chem*, 470-476.
- Zaman, G. J., Versantvoort, C. H., Smit, J. J., Eijdens, E. W., de Hans, M., Smith, A. J., vd., 1993. Analysis of the expression of MRP, the gene for a new putative transmembrane drug transporter, in human multidrug resistant lung cancer cell lines, *Cancer Res*, 1747-1750.
- Zaman, G., Flens, M., Van Leusden, M., de Haas, M., Mulder, H., Lankelma, J., vd., 1994. The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump, *Proc Natl Acad Sci USA*, 8822-8826.

- Zaman, G., Lankelma, J., van Tellingen, O., Beijnen, J., Dekker, H., Paulusma, C. vd., 1995. Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein, *Proc Natl Acad Sci USA*, 7690–4.
- Zang, Y., Thomas, S., Chan, E., Kirk, C., Freilino, M., DeLancey, H., vd., 2012. Carfilzomib and ONX 0912 inhibit cell survival and tumor growth of head and neck cancer and their activities are enhanced by suppression of Mcl-1 or autophagy, *Clin Cancer Res*, 5639–5649.
- Zangari, M., Suva, L., 2016. The effects of proteasome inhibitors on bone remodeling in multiple myeloma, *Bone*, 131–138.
- Zelcer, N., Huisman, M., Reid, G., Wielenga, P., Breedveld, P., Kuil, A., vd., 2003. Evidence for two interacting ligand binding sites in human multidrug resistance protein 2 (ATP binding cassette C2), *J Biol Chem*, 23538–23544.
- Zelcer, N., Saeki, T., Reid, G., Beijnen, J., Borst, P., 2001. Characterization of drug transport by the human multidrug resistance protein 3 (ABCC3), *J Biol Chem*, 46400–46407.
- Zelcer, N., van de Wetering, K., de Waart, R., Scheffer, G., Marschall, H., Wielinga, P., vd., 2006. Mice lacking MRP-3 (Abcc3) have normal bile salt transport, but altered hepatic transport of endogenous glucuronides, *J Hepatol*, 768–75.
- Zhan, F., Hardin, J., Kordsmeier, B., Bumm, K., Zheng, M., Tian, E., vd., 2002. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells, *Blood*, 1745-1757.
- Zhao, G., Wang, X., 2006. Advance in Antitumor Agents Targeting Glutathione-S-Transferase, *Curr Med Chem*, 1461-1471.
- Zhao, Y., Lu, H., Yan, A., Yang, Y., Meng, Q., Sun, L., vd., 2013. ABCC3 as a marker for multidrug resistance in non-small cell lung cancer, *Scientific Reports*, 1-6.
- Zheleznova, E., Markham, P., Edgar, R., Bibi, E., Neyfakh, A., Brennan, R., 2000. A structure-based mechanism for drug binding by multidrug transporters, *Trends Biochem Sci*, 39-43.
- Zhou, S. F., 2008. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica*, 802-832.
- Zhou, H., Aujay, M., Bennett, M., Dajee, M., Demo, S., Fang, Y., vd., 2009. Design and synthesis of an orally bioavailable and selective peptide epoxyketone proteasomeinhibitor (PR-047). *J. Med. Chem.*, 3028–3038.
- Zhou, W., Yang, Y., Xia, J., Wang, H., Salama, M., Xiong, W., vd., 2013. NEK2 induces drug resistance mainly through activation of efflux drug pumps and is associated with poor prognosis in myeloma and other cancers. *Cancer Cell*, 48-62.

Zhu, K., Dunner, K., McConkey, D., 2010. Proteasome inhibitors activate autophagy as a cytoprotective response in human prostate cancer cells. *Oncogene*, 451–462.

Ziegler, D., 1985. Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. *Ann Rev Biochem*, 305-2229.

Zolnerciks, J., Wooding, C., Linton, K., 2007. Evidence for a Sav1866-like architecture for the human multidrug transporter P-glycoprotein. *FASEB J*, 3937-48.

URL-1, <http://thd.org.tr/THD_Halk/?sayfa=miyelom> Erişim tarihi: 20.07.2018.



EKLER

Ek A KMS28 hücre hattı veri sayfası

Ek B KMS20 hücre hattı veri sayfası



Ek A. KMS28 hücre hattı veri sayfası.

Responsible BANK : HSRB(JCRB)

Cell number : JCRB1192

Cell name : KMS-28BM

(Other name) :

Animal : Human

[Basic Characteristic]

Genus : Homo

Species : sapiens

Strain :

Sex : F

Age : 77

Tissue : Bone marrow

Case History :

Metastasis : Yes

Organ metastasis :

Genetics : t(4;14)(p16.3;q32.3)

Life span : Infinite

PDL :

Morphology : Lymphocyte-like

Character : Small round-cell morphology, part is multinucleate cell.

History :

Original developer : Otsuki, T.

Regulation if any :

[Lot information]

LotNumber : 11042009

Passage number(1) : Unknown (5 at bank)

PDL :

Medium used : RPMI 1640 medium with heat-inactivated fetal bovine serum (GIBCO Cat. # 10099)

Temperature : 37 C

Cell density at seeding : $4.9 - 7.2 \times 10^5$ cells/ml

Methods for passages : Simple dilution.

Cell number in vial : 9.7×10^6 cells/1 mL

Antibiotics used : Free

Sterility/Bacteria : -

Fungi : -

Mycoplasma : -

Virus :

Doubling time : Approx. 53 hrs

Colony formation :

Viability(%) : 89.7

Isoenzyme analysis : Confirmed as human by NP, G6PD (type B), MD.

Ek B. KMS20 hücre hattı veri sayfası.

Responsible BANK : NIHS(JCRB)

Cell number : JCRB1196

Cell name : KMS-20

(Other name) :

Animal : Human

[Basic Characteristic]

Genus : Homo

Species : sapiens

Strain :

Sex : F

Age : 65

Tissue : Bone marrow

Case History :

Metastasis : No

Organ metastasis :

Genetics :

Life span : Infinite

PDL :

Morphology : Lymphocyte-like

Character : Small round-cell morphology, part is multinucleate cell.

History : Kawasaki Med. Univ. -> JCRB Cell Bank

Original developer : Otsuki, T.

Regulation if any :

[Lot information]

LotNumber : 05302011

Passage number(1) : Unknown (5 at bank)

PDL :

Medium used : (GIBCO Cat. # 10099)	RPMI1640 medium with 10% fetal bovine serum
Temperature :	37 C
Cell density at seeding :	0.6 - 1.3 x 10 ⁵ cells/mL
Methods for passages :	Simple dilution
Cell number in vial :	4.1 x 10 ⁶ cells/1 mL
Antibiotics used :	Free
Sterility/Bacteria :	-
Fungi :	-
Mycoplasma :	-
Virus :	
Doubling time :	Approx. 45 hrs.
Colony formation :	
Viability(%) :	94.5
Isoenzyme analysis :	Confirmed as human by NP, G6PD (type B), MD.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Gül KOZALAK

Adres : Merkez M. Gökali Durmaz S. İ.Durmaz Apt. No: 5 D: 29
Erdemli/ MERSİN

E-posta adresi : gulkozalak@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Dokuz Eylül Üniversitesi Biyoloji Öğretmenliği 2003-2008

Yüksek Lisans : Necmettin Erbakan Üniversitesi Biyoloji Eğitimi 2010-2013

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

1. Milli Eğitim Bakanlığı- Biyoloji Öğretmeni 2008/Halen
2. Karaman Valiliği Takdirname
3. Erciyes Üniversitesi, Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Laboratuvar Stajı, Kayseri

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR

Kongrelerde Sunulan Makaleler

1. Kozalak, G., Öksüzoğlu, E., 2017. The Role of MDR Genes at Developed Resistance Against Bortezomib in Multiple Myeloma Cell Lines, Turkish Journal of Biochemistry, Cilt 42 (S1), 48 (özet)
2. Kozalak, G., Öksüzoğlu, E., 2018. MDR Transporters Responsible for Time-dependent Extrusion of Bortezomib from Multiple Myeloma Cells, Turkish Journal of Biochemistry, Cilt 43 (S5), 29 (özet)