



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**MULTİPLE MİYELOMDA SİRKADİYEN RİTİM
DÜZENLEYİCİ *CLOCK* VE *BMAL1* GEN EKSPRESYON
DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAMİDE ALBAYRAK

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MERSİN
OCAK-2021**

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**MULTİPLE MİYELOMDA SİRKADİYEN RİTİM
DÜZENLEYİCİ *CLOCK* VE *BMAL1* GEN EKSPRESYON
DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAMİDE ALBAYRAK
ORCID ID: 0000-0002-8681-7729

DANIŞMAN
Doç. Dr. MUSTAFA ERTAN AY

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MERSİN
OCAK- 2021

ONAY

Hamide ALBAYRAK tarafından **Doç. Dr. Mustafa Ertan AY** danışmanlığında hazırlanan “**Multiple Miyelomda Sirkadiyen Ritim Düzenleyici Clock ve BMAL1 Gen Ekspresyon Seviyelerinin Araştırılması**” başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından **Gün/ Ay/ Yıl** tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği/çokluğu ile Yüksek Lisans Sanatta Yeterlik tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	
Üye	
Üye	
Üye	
Üye	

Yukarıdaki Jüri kararı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun **Gün/Ay/ Yıl** tarih ve / sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Bahar TAŞDELEN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi

beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific Works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

01 /01/ 2021

İmza / Signature

Hamide ALBAYRAK

ÖZET

MULTİPLE MİYELOMDA SİRKADİYEN RİTİM DÜZENLEYİCİ *CLOCK* VE *BMAL1* GEN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Multiple miyelom, kemik iliğinde B hücresi farklılaşması ile oluşan malign plazma hücrelerinin büyümesi ve infiltrasyonu ile karakterizedir. Oldukça heterojen olan bu hastalığın tedavisinde terapötik ajanlar ile yüksek doz kemoterapinin kullanılmasına rağmen, MM hastalarının prognozu diğer hematolojik malignitelerden daha kötüdür. Bu nedenle hastalığın altında yatan genetik etkileşimler daha iyi anlaşılmalıdır.

Sirkadiyen saat hem çevresel hem de içsel uyarılara cevap olarak homeostaza katkıda bulunan hücre içi ve hücreler arası 24 saatlik ritimsel salınımlardır. Bu ritimsel salınımlar, hücrede bir dizi saat geninin görev aldığı transkripsiyonel-translasyonel geri besleme döngülerinden oluşur. Organizmada gerçekleşen uyku-uyanıklık, kalp ritmi, kalp hızı, vücut ısısı, hormon salgılanması ve beslenme gibi önemli fizyolojik olaylarda görev alırlar. Bu nedenle sirkadiyen saat mekanizmasının bozulması sonucunda kanser gelişimine katkı sağlandığı ve saat genlerinin kanser tedavilerinde yeni teröpatik birer hedef olabileceği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında, sirkadiyen saat mekanizmasının pozitif düzenleyicileri olan *BMAL1* ve *CLOCK* genlerinin ekspresyon düzeyleri, Multiple miyelom hastalarından alınan kemik iliği örnekleri üzerinde kantitatif real-time PCR yöntemi kullanılarak araştırıldı.

Çalışma grubumuzda Multiple miyelom tanısı almış 46 hasta ve kontrol grubu olarak 13 sağlıklı birey yer aldı. Çalışmada 24 kadın ve 35 erkek olmak üzere toplam 59 bireylerden alınan kemik iliği örneklerinden total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen gen ekspresyon seviyeleri Shapiro-Wilk testi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi.

Araştırma sonuçlarımıza göre, Multiple miyelom grubundaki *BMAL1* geni ekspresyon düzeyinin kontrol grubuna göre artmış olduğunu ve saptanan bu farkın istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu saptadık ($p=0.011$). *CLOCK* geni ekspresyon düzeylerinde ise gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı fark saptanmadı.

Sonuç olarak sirkadiyen saat mekanizmasının transkripsiyonel düzenleyicileri olan *BMAL1* ve *CLOCK* genlerinin ekspresyon seviyelerinin incelenmesi, hematolojik kanserlerin altında yatan olayların daha iyi anlaşılmasına ve sirkadiyen saat elemanlarının kanser tedavisinde nasıl hedeflenebileceğinin anlaşılması üzerine literatüre katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Multiple miyelom, Sirkadiyen saat, *BMAL1*, *CLOCK*, Ekspresyon düzeyi

ABSTRACT

INVESTIGATION OF CIRCADIAN RHYTHM REGULATORY CLOCK AND BMAL1 GENE EXPRESSION LEVELS IN MULTIPLE MYELOMA

Multiple myeloma is characterized by the growth and infiltration of malignant plasma cells formed by B cell differentiation in the bone marrow. Despite the use of therapeutic agents and high-dose chemotherapy in the treatment of this highly heterogeneous disease, the prognosis of MM patients is worse than that of other hematological malignancies. Therefore, the genetic interactions underlying the disease should be better understood.

The circadian clock is a 24-hour rhythmic oscillation between and within cells that contributes to homeostasis in response to both environmental and internal stimuli. These rhythmic oscillations consist of transcriptional-translational feedback loops in which a number of clock genes are involved. They take part in important physiological events such as sleep-wake, heart rhythm, heart rate, body temperature, hormone secretion and nutrition in the organism. For this reason, studies have shown that as a result of the disruption of the circadian clock mechanism, it contributes to the development of cancer and that clock genes can be new therapeutic targets in cancer treatments.

In this thesis, the expression levels of *BMAL1* and *CLOCK* genes, which are positive regulators of the circadian clock mechanism, were investigated on bone marrow samples from Multiple myeloma patients by using quantitative real-time PCR method.

Our study group included 46 patients diagnosed with Multiple myeloma and 13 healthy individuals as the control group. In the study, total RNA isolation and cDNA synthesis were performed from bone marrow samples taken from 59 individuals, 24 women and 35 men. Gene expression levels obtained were statistically evaluated using the Shapiro-Wilk test.

According to our research results, we found that the expression level of *BMAL1* gene in the Multiple myeloma group was increased compared to the control group, and this difference was statistically significant ($p=0.011$). There was no statistically significant difference between the groups in *CLOCK* gene expression levels.

As a result, examining the expression levels of *BMAL1* and *CLOCK* genes, which are the transcriptional regulators of the circadian clock mechanism, will contribute to a better understanding of the underlying events of hematological cancers and to understand how circadian clock elements can be targeted in cancer therapy.

Keywords: Multiple myeloma, Circadian clock, BMAL1, CLOCK, Expression level

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, tüm bilgi birikimi ile ihtiyaç duyduğum her an yanımda olan, desteğini esirgmeden sabır ve inanca yol gösteren, akademik duruşu ve karakteri ile örnek olan, tezimin hazırlanma sürecinde ve öncesinde göstermiş olduğu bilimsel katkıları için danışman hocam Doç. Dr. Mustafa Ertan AY'a,

Bilimsel ve akademik katkılarından dolayı Anabilim dalımızın değerli hocaları; Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL' a ve Prof. Dr. Özlem İZCİ AY' a,

Multiple miyelom tanısı almış bireylerden kemik iliği örneklerinin toplanmasını organize eden ve çalışmamıza destek veren Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Anıl TOMBAK ve hematoloji kliniği çalışanlarına,

İstatistiksel analizlerin yapılmasında yardımcı olan Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Ana Bilim Dalı'ndan Nihan ÖZEL ERÇEL'e ve tezimin deneysel sürecinde verdiği destek için değerli arkadaşım Dr. Kenan ÇEVİK' e,

Bu günlere gelmemde her türlü özveride bulunarak beni destekleyen ve hiçbir zaman yalnız bırakmayan başta canım annem ve babam olmak üzere tüm aileme çok teşekkür ediyorum.

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 2020-1-TP2-4041

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR ve SİMGELER	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	4
2.1. Sirkadiyen Ritim	4
2.1.1. Sirkadiyen Ritimlerin Moleküler Mekanizması	5
2.1.2. Sirkadiyen Ritim ve Hücre Döngüsü	6
2.1.3. Kanser Gelişiminde Sirkadiyen Ritimler	8
2.2. Multipl Miyelom	12
2.2.1. Multipl Miyelom Epidemiyolojisi	13
2.2.2. Multipl Miyelomda Sitogenetik Anomaliler	13
2.2.2.1. Multipl Miyelomda Birincil Sitogenetik Anomaliler	15
2.2.2.2. Multipl Miyelomda İkincil Sitogenetik Anomaliler	16
2.2.3. Multipl Miyelomda Kemik İliği Mikro Ortamı	18
3. MATERYAL ve YÖNTEM	20
3.1. HASTA SEÇİMİ VE ÖRNEKLERİN TOPLANMASI	20
3.1.1. Dahil Olma/Olmama Kriterleri	20
3.2. Kullanılan Araç-Gereç ve Malzemeler	21
3.2.1. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Ekipmanları	21
3.2.2. Kullanılan Kimyasallar ve Saf Malzemeler	21
3.3. Kemik İliği Örneklerinden Total RNA Eldesi	22
3.4. RNA Örneklerinin Spektrofotometrik Analizi ve cDNA Sentezinde Kullanılacak RNA Kalıp Miktarlarının Belirlenmesi	23
3.5. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	23
3.6. Real-Time qPCR ile Gen Ekspresyonu Analizi	24
3.7. qPCR Verilerinin Analizi	26
	28
	vii

	Sayfa
3.8. İstatistik	
4. BULGULAR	30
4.1.KONTROL VE HASTA GRUPLARININ YAŞ VE CİNSİYET BAKIMINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ	30
4.1.1. Kontrol Ve Hasta Gruplarının Yaş Bakımından Değerlendirilmesi	30
4.1.2. Kontrol Ve Hasta Gruplarının Cinsiyet Bakımından Değerlendirilmesi	30
4.2. Vaka ve Kontrol Gruplarının Gen Ekspresyon Düzeyi Bakımından Değerlendirilmesi	31
4.3. Vaka ve Kontrol Grubunda BMAL1 ve CLOCK Ekspresyon Seviyelerinin Cinsiyet Bakımından Değerlendirilmesi	32
4.4. Vaka ve Kontrol Grubunda BMAL1 ve CLOCK Arasındaki Ekspresyon Seviyeleri Bakımından Değerlendirilmesi	33
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	35
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	50

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Sirkadiyen saat genlerinin promotör bölgelerinde oluşan metilasyon düzenlemelerinin ilişkilendirildiği insan kanserleri	11
Tablo 2.2. Multipl miyelomda birincil ve ikincil anomaliler	14
Tablo 2.3. Multiple miyelom için risk sınıflandırma modellerine göre sitogenetik anomalilik için prognoz	15
Tablo 3.1. Total RNA eldesi deneyinin aşamaları	22
Tablo 3.2. cDNA reaksiyonu için 1. karışım	23
Tablo 3.3. cDNA reaksiyonu için 2. karışım	24
Tablo 3.4. qPCR analizinde kullanılan miRNA primer ve prob dizileri	25
Tablo 3.5. Real-time-PCR gen ekspresyonu için kullanılan solüsyonlar ve miktarları	25
Tablo 4.1. Hasta ve kontrol gruplarının yaş ortalaması bakımından değerlendirilmesi	30
Tablo 4.2. Hasta ve kontrol gruplarının cinsiyet bakımından değerlendirilmesi	31
Tablo 4.3. Kontrol ve MM gruplarındaki grubundaki gen ekspresyon seviyeleri bakımından değerlendirilmesi	31
Tablo 4.4. Vaka ve kontrol grubunda BMAL1 ve CLOCK arasındaki ekspresyon seviyeleri bakımından değerlendirilmesi.	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Sirkadiyen saatin moleküler yapısı	6
Şekil 2.2. Sirkadiyen saat kontrolünde hücre döngüsü	7
Şekil 2.3. Tümör ve otonom sirkadiyen saat	10
Şekil 2.4. Genetik anomaliler ve mikroçevre etkisi ile plazma hücrelerinin MM ve yüksek riskli hastalığa ilerlemesi	17
Şekil 3.1. Multiple miyelom örneğinde BMAL1 ifadesinin Real-Time PCR görüntüsü	27
Şekil 3.2. Multiple miyelom örneğinde CLOCK ifadesinin Real-Time PCR görüntüsü	28
Şekil 4.1. Kontrol ve MM gruplarındaki gen ekspresyon seviyeleri bakımından grafiği	32
Şekil 4.2. Kontrol ve MM gruplarında cinsiyete bakımından gen ekspresyon seviyeleri grafiği	33

KISALTMALAR ve SİMGELER

KISALTMA/SİMGE	TANIM
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
3'UTR	3'-untranslated region
ALL	Akut lenfosittik lösemi
AML	Akut miyeloid lösemi
ATM	Mutant ataksi telenjiektazi
ATR	Rad3 ilişkili telenjiektazi
BMAL1	Brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear
CCG's	Saat kontrollü genler
CDK	Cyclin dependet kinase
cDNA	Komplementer DNA
CHK1-2	Checkpoint kinases1-2
CLOCK	Circadian locomotor output cycles kaput
CRY1-2	Cryptochrome1-2
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DNTP	Deoksinükleotid trifosfat
E-BOX	Enhancer box
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
KML	Kronik miyeloid lösemi
mRNA	Haberci ribonükleit asit
MYC	Protooncogene, bHLH transcription factor
NHL	Non- Hodgking Lenfoma
P53	Tumor Supressor protein 53
PER1-3	Period 1-3
qRT-PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
REV-ERB	Nuclear Receptor Rev-ErbA-alpha
ROR	Retinoid related orphan receptor alpha
SCN	Suprakiazmatik çekirdek
WEE1	WEE1 homolog
WHO	Dünya sağlık örgütü

1. GİRİŞ

Sirkadiyen saat organizmanın gece-gündüz döngüsüne senkronize olmasını sağlayan 24 saatlik salınımlardır. Memelilerde biyolojik saat sistemi uyku-uyanıklık, beslenme, kan basıncı ve vücut ısısı gibi önemli fizyolojik olayların düzenlenmesinde rol alır. Sirkadiyen saat sisteminin kanser gelişimindeki rolü tam olarak anlaşılmamış olsa da son yıllarda artan kanıtlar saat mekanizmasının kanser gelişiminde bozulduğu yönündedir. Kanser hücreleri sirkadiyen ağ sistemini bozarak hücrelerin metabolizma ve gen ekspresyonu düzenlenmesini bozarak büyüme avantajı sağlayabilir (1,2,3).

Organizmalar çoğu zaman çevrelerinde meydana gelen değişimlere uyum sağlamak ve bu değişimlere karşı uygun fizyolojik tepkiler vermek durumunda kalırlar. Memeli hücrelerinde bu ritimler, bir transkripsiyonel-translasyonel otheregülatuar geri besleme döngülerine (TTFLs) dayanan hücre içi saat genleri tarafından üretilir. Bu sayede fizyolojik ve davranışsal süreçler dış çevre ile senkronize edilmiş olur. Günümüzde sirkadiyen saat mekanizmasının hücre döngüsü, hücre çoğalması ve apoptoz ile yakın bir ilişki içinde olduğu bilinmektedir. Bu nedenle sirkadiyen ritimlerin bozulmasının kanser gelişimi ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür(4,5).

Beynin hipotalamus bölgesinde yer alan Suprakiazmatik çekirdek (SCN) organizmada merkezi saat olarak görev yapar ve periferik dokularda yer alan çevresel saatler ile bir hiyerarşi oluşturarak çalışırlar. Hem merkezi hemde çevresel saatler bir takım ipuçlarını kullanarak çalışırlar. Bu ipuçlarına *zeitgeber (zamanlayıcı)* adı verilir ve anlamı zaman verici işaretlerdir. En güçlü zeitgeber SCN'nin aldığı ve sirkadiyen döngüyü sıfırlayarak başa alan ışıktır. Işık SCN'ye ulaşarak, bir transkripsiyon faktörü olan CREB'in (cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein) fosforilasyonu yolu ile saat genlerinden olan *PER1*'in (Periyod sirkadiyen düzenleyicisi 1) ekspresyonunu düzenler. Bu sayede dışarıdan gelen ışık bilgisi SCN'deki sirkadiyen saat mekanizması tarafından işlenir ve diğer dokulardaki perifer saatlere ileterek tüm dokuların aynı anda ışığa karşı senkronize olması sağlanmış olur. Perifer saatler ise ışık dışındaki bilgileri alır. Örneğin açlık durumunda salınan glukokortikoid ve glukagon hormonları da ışık gibi *PER1*'in transkripsiyonunu düzenlerler. Ayrıca sıcaklık ve oksijeninde çevresel saatler için bir zeitgeber olduğu bildirilmiştir. Merkezi ve çevresel saatlerin dışarıdan aldıkları bu bilgiler hücrede gen ifadesinde değişime neden olarak transkripsiyonel geri besleme döngülerinin çalışmasını sağlarlar. Tüm bu bilgi akışı sayesinde hücre ve organizma düzeyinde 24 saat süren ritmik olaylara neden olur(6,7,8).

Hücrede yer alan sirkadiyen saat mekanizması, pozitif ve negatif geri besleme döngülerinin sisteminden oluşmaktadır. İlk olarak CLOCK (Saat sirkadiyen düzenleyicisi) ve BMAL1 (ARNTL; Aril Hidrokarbon Reseptörü Nükleer Translokator Gibi) çekirdekte heterodimerize olarak kontrol ettikleri saat kontrollü genlerin (CCG's) enhanser bölgelerine

bağlanırlar. Kontrol ettikleri genler arasında PER1-2-3, CRY2 (Kriptokrom sirkadiyen düzenleyici 2), ROR (RAR ile ilgili yetim reseptör) ve diğer CCG'ler vardır. Bu olay gün boyunca devam ederek CCG'lerin ekspresyonu sağlanır. PER ve CRY proteinleri gün boyu sitoplazmada birikir ve daha sonra heterodimer olarak çekirdeğe transloke olur. Gece boyunca BMAL1-CLOCK tarafından düzenlenen transkripsiyonel aktiviteyi baskılayarak negatif geri besleme döngüsü oluşturur. Sirkadiyen saat genleri aynı zamanda REV-ERB (NR1D; Nükleer Reseptör Alt Ailesi 1 D Grubu) ve ROR tarafından düzenlenir. Bunların düzenledikleri genler arasında ise CLOCK, BMAL1, CRY1 ve diğer CCG'ler sayılabilir. ROR düzeyi gece zirveye ulaşır saat kontrollü genleri pozitif yönde düzenlerken, REV-ERB düzeyi gündüz zirve yapar ve bu saat kontrollü genlerin transkripsiyonu baskılar. Sonuçta bu transkripsiyonel ağ 24 saatlik dilimler halinde ritmik olarak devam eder ve saat kontrollü genlerin ifadesi de ritmik olarak düzenlenmiş olur. Bu düzenleyici geri besleme döngülerinin tüm hücrelerde birkaç binden oluşan saat kontrollü genleri kontrol ettikleri bilinmektedir(6,9,10).

CLOCK ve *BMAL1* genlerinin kanser hastalarında araştırıldığı çalışmalar kısıtlıdır. Düşük *BMAL1* ekspresyonu, pankreas adenokarsinomu, melanom ve kolorektal kanserde tümör ilerlemesi, düşük histolojik farklılaşma ve kötü prognoz ile ilişkilidir (11,12,13,14). Bunu destekleyici olarak *BMAL1*'in yüksek ekspresyonu insan hepatoselüler karsinom, osteosarkom, hematolojik, kolorektal ve yumurtalık malignlerinde tümör büyümesini azaltabilir (15,16,17,18). Benzer şekilde *CLOCK* geni polimorfizmleri meme kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir(19). Bu ve yapılan birçok çalışma saat mekanizmasının düzenleyici genlerinin tümör baskılayıcı özelliklerini açıklamaktadır.

MM, B hücrelerinin farklılaşmasıyla oluşan plazma hücrelerinin malign forma dönüşmesi ile gelişir(20,21). Kemik iliği içinde çoğalan MM hücreleri monoklonal immüoglobulinler, kemokinler ve sitokinler üreterek klinik tabloya katkı sağlar(22). MM, ikinci en yaygın hematolojik kanserlerden biri olmakla birlikte MM hücreleri içinde bulunduğu kemik iliği mikro çevresi ile yakın ilişkiye girer. Bu ortam MM ye neden olan hücrelerin hayatta kalmasını, çoğalmasını ve ilaç direncini etkiler(23,24). Tüm hematolojik kanserlerin %13'ünü oluşturan MM hastalığının tedavisinde kök hücre transplantasyonu, immünmodülatör ilaçlar, proteozom inhibitörleri ve monoklonal antikorlar gibi tedavi seçenekleri hastalığın genel sağkalımını uzatsa da hastalık şuan tedavi edilemez durumdadır(25,26). Bu nedenle MM'nin altında yatan genetik olayların daha iyi anlaşılması sonucunda yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi gerekmektedir

Sirkadiyen saat mekanizması hücre döngüsü, apoptoz, hücre metabolizması ve organizmanın dış dünyaya karşı uyum sağlaması gibi önemli biyolojik süreçlerde yer almaktadır. Günümüzde sirkadiyen saat mekanizmasının karsinogenez sürecindeki rolü tam olarak bilinmiyor olsa da bu genlerin kanser gelişimi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Çeşitli doku ve kanser türlerinde sirkadiyen saat mekanizmasının farklı roller göstermesi bu konuda ki

belirsizliği arttırmaktadır. Sirkadiyen saat mekanizmasının kanser hücrelerinde gerçekten bozulduğu ya da kanser hücrelerinin bölünmesi için saat genlerine ihtiyaç duyabileceği soruları bu konuda aydınlatılması gereken noktalardır. MM ise, altında yatan birçok mutasyon ve genomik dengesizlikten dolayı oldukça heterojen bir hastalıktır. Şuan hala tedavi edilemez durumdadır ve çoğu hasta tedaviden sonra nüks yaşamaktadır. Hastalığın tedavisi için hem MM hücrelerini hem de kemik iliği nişini hedefleyen yeni teröpatik hedeflerin bulunması hastalığın tedavisine katkı sağlayacaktır.

Yaptığımız bu çalışmada sirkadiyen saat mekanizmasında düzenleyici görevleri olan *CLOCK* ve *BMAL1* gen ifade düzeyi değişimlerinin, MM gelişimindeki rolünün aydınlatılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Sirkadiyen Ritim

Tüm canlı organizmalar sahip oldukları fizyolojik tepkileri ve ritimsel davranışlarını düzenlemek için doğal saatlere sahiptirler. Bu zamanlama sistemlerinden biri olan biyolojik saat, dünyanın dönüşünün bir sonucu olan aydınlık-karanlık döngülerini öngörmek üzerine çalışırlar. 24 saatlik döngü sonucunda oluşan ritimlere '**sirkadiyen**' denir(27,28). Bu biyolojik saatler hücre içinde moleküler mekanizmalar şeklinde kurulmuştur ve canlının çevresinde gerçekleşen değişikliklere uyumunu sağlarlar. Organizmada yer alan tüm somatik hücrelerde moleküler sirkadiyen saat mekanizmaları vardır ve bunları çalışması ile CCG'lerin transkripsiyonu sağlanır. Sirkadiyen saatlerin önemli özelliklerinde biri dışarıdan belirli ipuçları alsalar bile, kendi kendine çalışma yeteneklerinin olmasıdır (29).

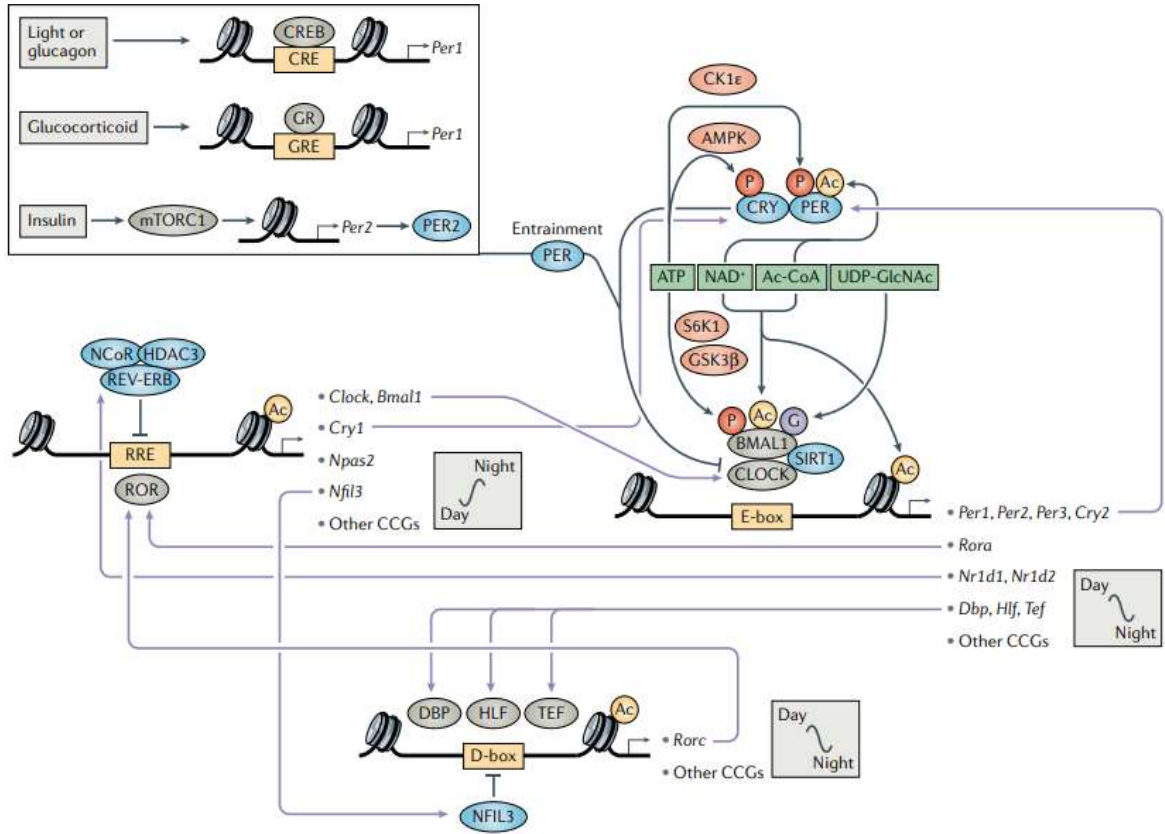
Sirkadiyen saat hem çevresel hem de içsel uyarılara cevap olarak hemeostaza katkıda bulunan hücre içi ve hücreler arası 24 saatlik ritimsel salınımlardır. Memelilerde sirkadiyen saatler, gündüz-gece döngüsüne karşı davranışsal ve fizyolojik aktiviteler senkronize edilmeye çalışılır. Sirkadiyen saat uyku-uyanıklık, kalp ritmi, kalp hızı, vücut ısısı, hormon salgılanması ve beslenme gibi önemli fizyolojik olayların düzenlenmesinde yer alır(30,31). Sirkadiyen saatin hücre içindeki moleküler mekanizması, ritmik şekilde salınan proteinlerin karşılıklı etkileşimi sonucunda oluşan transkripsiyonel-translasyonel geri besleme döngülerinden oluşur. Günümüze kadar yapılan çalışmalar doğrultusunda herhangi bir hücre veya dokuda var olan genlerin %20'sinin sirkadiyen ritmikliğe sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca farklı dokularda sirkadiyen olarak düzenlenen genler farklı olduğundan canlıda genlerin %50'den fazlası saat kontrollü genleri oluşturabilir (CCG's) (32,33).

Sirkadiyen saatler, SCN içindeki merkezi saatten ve organlardaki çevresel saatlerden oluşur. Hücresel sirkadiyen saat mekanizması dışarıdan '**zeitgeber**' olarak adlandırılan doğal ipuçlarını alarak çalışır. Bu doğal ipuçları içinde gece-gündüz döngüleri, egzersiz, dinlenme, beslenme ve sıcaklık gibi belirteçler sayılabilir. Işık sirkadiyen saat tepkimelerini uyaran en güçlü zeitgeberden biridir(34,35). Beynin hipotalamus alanında bulunan ve yaklaşık 20.000 nörondan oluşan SCN alanı, organizmada yer alan sirkadiyen mekanizmasının 'merkezi saati' olarak adlandırılır. Gözün retinasından SCN'ye uzanan retinohipotalamik yol (RHT) aracılığı ile ışık merkezi saate ulaşır. Burada bulunan saat genlerinin ışık bilgisi ile aktive edilmesi sonucu hücre içindeki transkripsiyonel saat mekanizması çalışır. Sonuçta SCN, kendi dışında kalan dokulardaki 'çevresel saatlere' sirkadiyen bilgileri iletmek için retina proteinleri ailesine ait bir tür fotopigment olan melanopsinden gelen ışık sinyallerini elektriksel ve hormonal sinyallere

dönüştürür. Ayrıca ışık varlığında SCN nöronları, melatonin uyarılmasını sağlayan paraventricüler hipotalamik çekirdeği (PVN) inhibe eder. Bu sayede ışık ortamında melatonin salgılanması baskılanır. Çevresel saatler ise, SCN'den bağımsız olarak çalışır ve çoğu organda olduğu tanımlanmıştır. Işık bilgileri SCN tarafından yorumlanıp iletilirken, ışık dışında kalan diğer ipuçları çevresel saatler tarafından alınır. Işık bilgisinin iletilmesi çevresel saatlerin aydınlık karanlık döngülerine senkronizasyonunu sağlar. Bu senkronizasyon sonucunda hem hücre düzeyinde gerçekleşen olayların belirli zaman dilimlerinde düzenlenmesi sağlanarak hücre içi organizasyon oluşturulur hem de organizmanın dış dünyadaki döngülere uyumunu sağlar. (33-36-37).

2.1.1. Sirkadiyen Ritimlerin Moleküler Mekanizması

Çevresel değişikliklere uyum sağlama potansiyeli, memeli homeostazında önemli bir yere sahiptir. Moleküler düzeyde hücrelerde var olan saat mekanizması bir dizi transkripsiyonel-translasyonel otopregülatuar geri besleme döngülerinden oluşur(38). Bu ağ sisteminin pozitif düzenleyicileri olan CLOCK ve BMAL1 heterodimer halde hedefledikleri saat kontrollü genlerin (CCG's) promotor bölgelerindeki enhanser bölgelerine bağlanarak ekspresyonunu düzenler. Bu olay gün boyunca devam eder. Şekil 2.1'de görüldüğü üzere BMAL1-CLOCK'ın kontrol ettiği genler arasında *PER1-2-3*, *CRY2*, *RORa*, *Nr1d1-Nr1d2*, *Dbp*, *Hlf*, *Tef* ve diğer saat kontrollü genler (CCG's) sayılabilir. Gündüz sitoplazmada biriken PER ve CRY heterodimereleşerek çekirdeğe transloke olur ve gece boyunca BMAL1-CLOCK aracılı transkripsiyonu baskılar. BMAL1-CLOCK'ın aksine PER ve CRY dimeri, hem kendi hem de diğer saat genlerinin ifadesini negatif geri besleme döngüsü ile düzenlemiş olurlar. PER ve CRY'nin sitoplazmada proteozomal bozulması ile miktarı azalmaya başlar ve BMAL1-CLOCK üzerindeki baskı kalkar. Çekirdek saat genleri ayrıca ROR'lar ve REV-ERB'ler tarafından kontrol edilir. ROR'lar pozitif düzenleyici ve gece maksimum noktaya ulaşırken REV-ERB'ler negatif baskılayıcıdır ve gündüz en yüksek miktarına ulaşır. Bu nedenler ROR ve REV-ERB'in transkripsiyonunu düzenlediği *CLOCK*, *BMAL1*, *CRY1*, *Npas2*, *Nfil3* gibi genlerin ekspresyonu gece maksimuma ulaşır. Ayrıca ışık, glukagon, glukokortikoid ve insülin gibi uyarıcılar hücrede PER1-2'nin transkripsiyonunu başlatarak dışarıdan gelen bilgilerin hücre içine aktarılmasını sağlarlar. Bu sayede hücre ile dış çevresinde gerçekleşen olayların bilgisi sirkadiyen saat mekanizmasına entegre edilmiş olur(6,39).

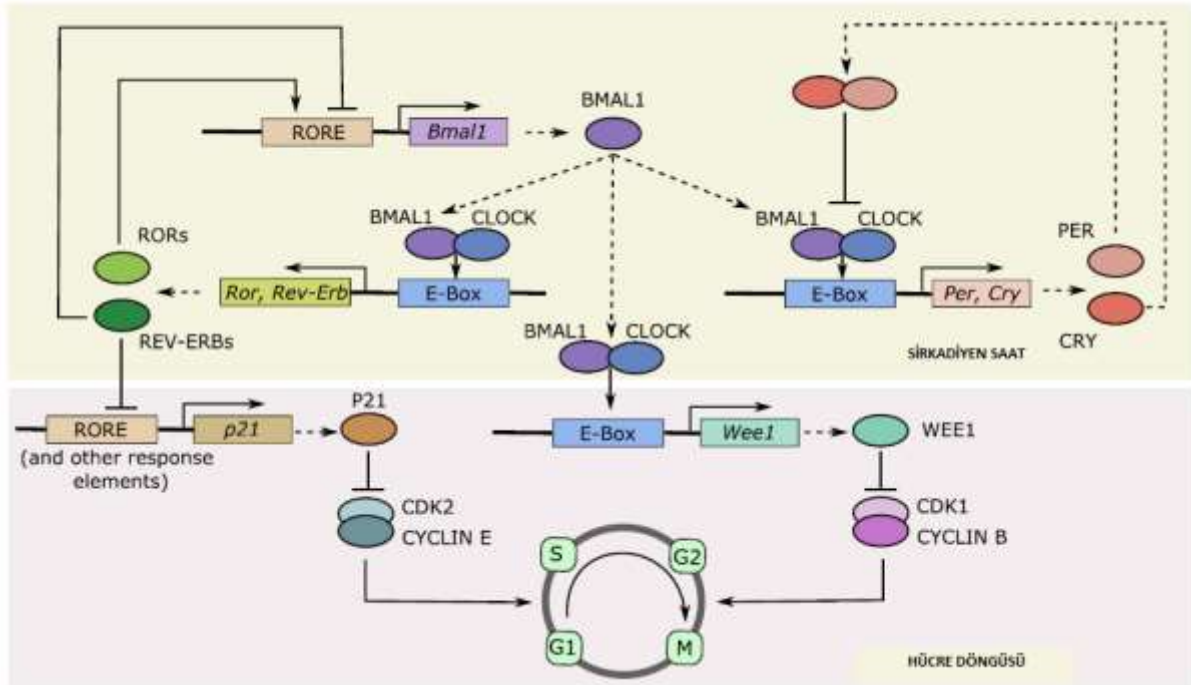


Şekil 2.1. Sirkadiyen saatin moleküler yapısı(6)

2.1.2. Sirkadiyen Ritim ve Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü ilerlemesi siklinler ve siklin bağımlı kinazlar (CDK) tarafından düzenlenir. G1-S geçişinde, büyüme faktörlerine cevap siklinD artışı ile verilir. SiklinD-CDK4/6 kompleksleri pRB'nin (retinoblastoma proteini) fosforillenmesini sağlar ve E2F üzerinde baskılama kalkarak siklinE, siklinA ve CDK2'yi kodlayan genlerin transkripsiyonu sağlar. Böylece hücrenin G1 fazına ilerlemesi sağlanır. Oluşan siklin E-CDK2 aktivitesi pozitif geri besleme yolu ile E2F'ye bağlı transkripsiyonu artırarak daha fazla siklinE/A-CDK2 yapılarının oluşmasına yol açar ve G1'den S evresine geçişi sağlar. S evresinde ilerleme ve DNA replikasyonun başlaması siklinA-CDK2 tarafından uyarılır. SiklinA CDK1 birikmesi S fazından sonra G2 kontrol noktasına ilerlemeyi sağlar. SiklinB-CDK1 kompleksi mitotik girişi uyarır ve sonuçta hücre bölünme aşamasını tamamlar. CDK1, siklinA ve B ile birleşir. CDK1'in aktivitesi üzerinde WEE1/MYT1 kinazları tarafından sağlanan baskılayıcı etkisi ile erken mitoz girme önlenir. Bir fosfotaz olan CDC25'in CDK1 üzerindeki uyarıcı etkisi ise mitoz ilerlemeyi sağlar. Böylece mitozda hız sınırlaması sağlanmış olur. (40,41).

Sirkadiyen saat ve hücre döngüsünün düzenleyici elemanları şekil 2.2'de görüldüğü gibi sıkı bir ilişki içindedir. Sirkadiyen saat transkripsiyonel ağı, hücre döngüsünde yer alan siklinlerin ekspresyonunu kontrol ettiği gibi hücre döngüsü baskılayıcıları olan *WEE1*, *p21*, *p27* ve *p57* gibi genlerin ifade edilmesinde görev alır. G1 evresinin ilerlemesinde rol alan siklinD1 sirkadiyen ağ tarafından kontrol edildiği bilinmektedir. Örneğin *WEE1* ve *MYC* promotor bölgesinde bir E kutusu taşır. *WEE1*, BMAL1-CLOCK tarafından sirkadiyen olarak düzenlenen saat kontrollü genlerden biridir ve mitozu geçiş sırasında CDK baskılayıcısı olarak çalışır. *MYC* ise hücre döngüsüne girişte CDK4/6'nın aktifleşmesini sağlar ve transkripsiyonu BMAL1-NPAS2 (Nöronal PAS alan proteini 2) tarafından kontrol edilir. Sadece BMAL1-CLOCK değil diğer saat elemanları da hücre döngüsünün düzenlenmesine katkı sağlar. Örneğin saat geni olan BMAL1 ve *p21*'in ifade edilmesini yine saat elemanları olan ROR ve Rev-ERB antagonistik şekilde düzenlenmektedir. P21, G1-S geçişinde DNA hasarı durumunda siklinE-CDK2 ifadesini baskılayan bir tümör süpresördür. Saat elemanlarından olan PER ve NONO protein kompleksinin, CDK4/6 inhibitörü olarak çalışan p16'nın gen ifadesini düzenledikleri bildirilmiştir. Bu örnekler bize hücre döngüsünün sirkadiyen saat elemanları tarafından nasıl düzenlendiklerini ve aralarındaki ilişkiyi gösteren perspektif sunmuştur(29,42).



Şekil 2.2. Sirkadiyen saat kontrolünde hücre döngüsü(43)

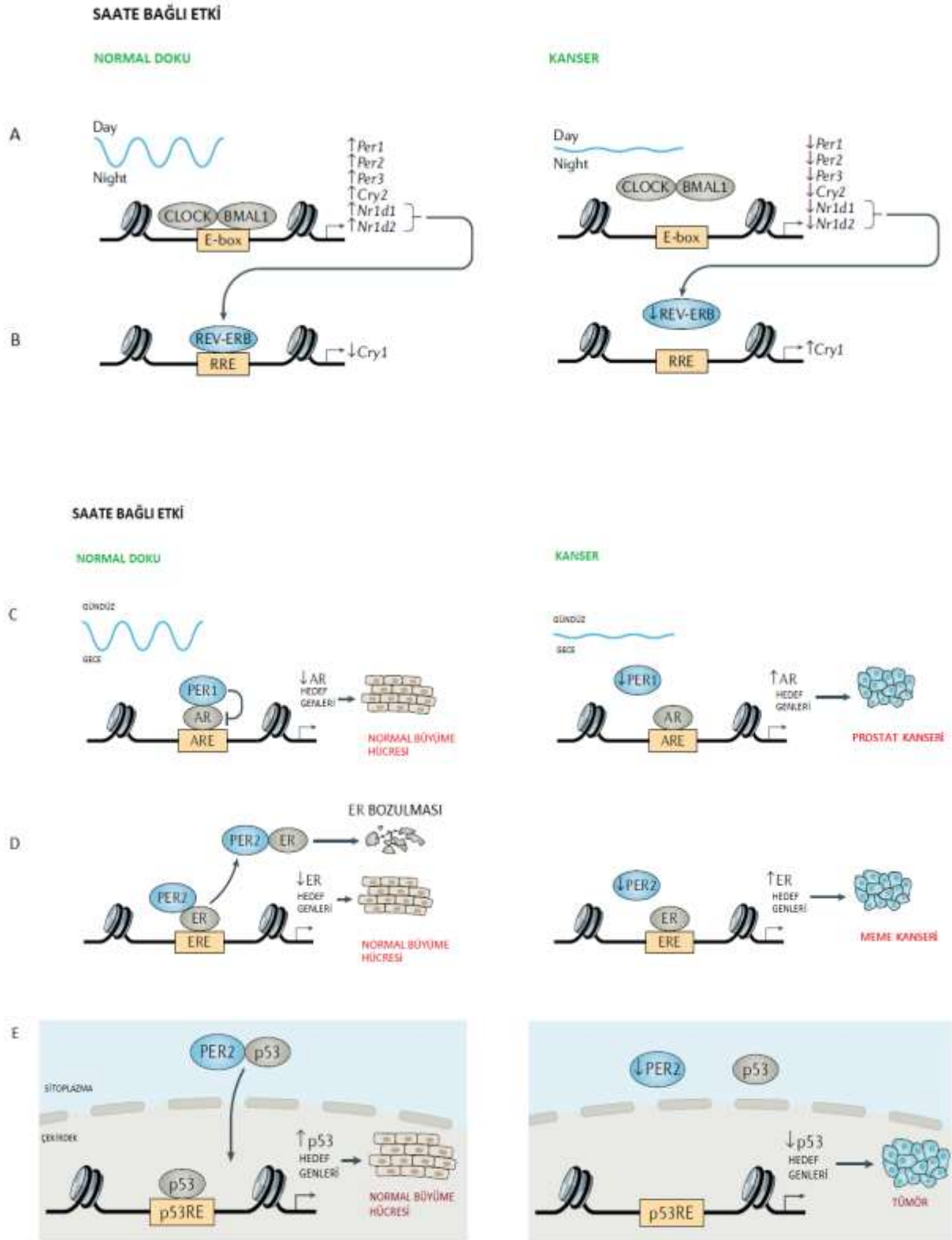
Sirkadiyen saat ve hücre döngüsü arasındaki temel fark, DNA hasarı durumunda hücre döngüsünün sahip olduğu kontrol noktalarıdır. Sirkadiyen saat ağı, hücre döngüsünün elemanlarını düzenlemenin yanı sıra DNA hasarına yanıt sırasında hücre döngüsü kontrol noktalarındaki elemanlar ile etkileşime girer. DNA çift sarmal kırığı durumunda aktive edilen ATM, saat elemanı olan PER1 ile birleşir. Aynı zamanda PER1, ATM'ye ek olarak G2-M geçişini bloklayan CHK2 ile birleşir. ATM-CHK2-PER1 birlikteliği, p53 üzerinden P21'in aktivasyonu ile hücre döngüsünün durması sağlanır. Başka bir örnek olarak replikasyon stresi durumunda TIM, ATR proteini ile etkileşime girer. TIM-ATR-CHK2 ile etkileşime girerek, CDC25'in fosforilasyonu yolu ile hücre döngüsünü yavaşlatırlar. Bu örnekler bize DNA hasarı durumunda sirkadiyen saat mekanizması ile hücre döngüsünün iç içe geçtiğini göstermektedir. Ayrıca protein stabilizasyonunun sağlanması için ubikinitasyon ve fosforilasyon olaylarında hem sirkadiyen saat mekanizmasının hemde hücre döngüsünün ortak olarak aynı enzimleri kullanması, bu iki osilatörün kesiştiği bir diğer noktadır (29,44).

2.1.3. Kanser Gelişiminde Sirkadiyen Ritimler

Sirkadiyen saatler, endojen olarak 24 saatlik ritimlerden oluşur ve bu saat mekanizması ağının bozulması sonucunda kanser gelişimine katkı sağladığı günümüze kadar yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Sirkadiyen saat mekanizması transkripsiyonel geri besleme döngülerinden oluşur. İnsan tümörlerinde saat genlerinin ifadesi genellikle düzensizdir. Yapılan çalışmalarda uykudan yoksun kalma, jet-lag, gece vardiyasında çalışma ve yapay ışığa maruz kalma durumlarında sirkadiyen ritimlerin bozulduğu gösterilmiştir. Bu bozulmanın insanlarda uykusuzluk, depresyon, kanser, metabolik ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konmaktadır(45,46,47). Gece-gündüz senkronizasyonu olmamasından dolayı sirkadiyen saatin bozulması sonucunda fizyolojik düzensizliklerin ortaya çıkması, saat mekanizmasının önemli hücresel olaylarda yer alması olarak düşünülmüştür. Sirkadiyen saatin hücre bölünmesi, apoptoz, DNA onarımı, hücre yaşlanma, metabolik hemeostaz, zararlı maddelerin detoksifikasyonu, oksidatif stres ve immun yanıtı düzenleme gibi önemli hücresel olaylarda yer almasından dolayı çeşitli hastalıkların oluşumuna neden olabileceği düşünülmektedir. Sirkadiyen saat özellikle kanser metabolizması ile ilişkilendirilmiş olup, bu hastalığın tedavisinde önemli biyolojik belirteç olabilecekleri düşünülmüştür. Aynı zamanda saat genleri kaybının ya da mutasyonunun çeşitli patolojik sonuçlar ve kanser gelişme riski ile ilişkili olduğu yapılan hayvan çalışmaları ile doğrulanmıştır(33,48).

Sirkadiyen ritimler hücrelerde gerçekleşen DNA hasarının bir sonucu olarak bozulabileceği gibi çevresel faktörlerde bu mekanizmanın bozulmasına katkı sağlayabilir. İnsanın sürekli ışığa maruz kalması veya düzensiz gerçekleşen beslenme döngüleri sirkadiyen ritimleri bozabilir. Vardiyalı çalışmalar ve uyku bozuklukları üzerine yapılan çalışmalar sürekli gerçekleşen sirkadiyen ritim bozukluğu ve kanser arasında ilişki kurulmasını sağlamıştır. Örneğin vardiyalı çalışan insanlarda sabah erken işe başlama veya gece vaktinde iş yapmalarının yanında tatil günlerinde normal sosyal hayat sürdürmeye çalıştıklarında sirkadiyen ipuçlarının yanlış alınmasına neden olabilir. Bu durum sirkadiyen ritimdeki bozukluklar ile sonuçlanır(49,50). Bazı epidemiyolojik çalışmalar 20 yıldan fazla süredir vardiyalı çalışan insanlarda meme ve prostat kanseri gelişme riskinin arttığını göstermektedir(51). 2007 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) bir uzantısı olan Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) sirkadiyen bozulmayı bir insan kansorejeni olarak listelemiştir(52).

Sirkadiyen döngü içinde CLOCK ve BMAL1, şekil 2.3.A'da gösterildiği gibi kendi baskılayıcıları olan *PER1-2-3*, *CRY2*, *Nr1d1-2* (REV-ERB kodlayan gen) ve diğer saat kontrollü genlerin (CCG's) ifade edilmesini gün boyunca düzenler. Kanser hücrelerinde ise, bozulan BMAL1-CLOCK ekspresyon seviyesi sonucunda sirkadiyen baskılayıcılar olan PER ve REV-ERB gibi negatif düzenleyicilerin transkripsiyonu ortadan kalkar. REV-ERB'ler normal koşullarda BMAL1, CRY1 ifadesini baskılayarak çalışır. Ancak kanser hücrelerinde BMAL1-CLOCK'un azalan ekspresyonu sonucunda REV-ERB'lerde azalır. Bu durum sonucunda şekil 2.3.B'de gösterildiği gibi CRY1'in transkripsiyonu üzerindeki baskının kalkmasına neden olur. Normal prostat hücrelerinde PER1, androjen reseptörüne (AR) bağlanarak, AR aracılı transkripsiyonu baskılar (şekil 2.3.C) ve normal hücre büyümesi ve bölünmesi gerçekleşir. Ancak kanser hücrelerinde azalan BMAL1-CLOCK ifadesi yine azalan PER1 ifadesine neden olduğu için prostat kanserlerinde AR aracılı transkripsiyon engellenemez. Bu durumun benzer bir örneği şekil 2.3.D'de gösterilen meme kanseri üzerine verilebilir. Yine BMAL1-CLOCK'ın düzenlediği transkripsiyonun bozulması sonucunda PER2 azalır ve bu durum meme kanserinde östrojen reseptörü (ER) aracılı transkripsiyona neden olarak kanser gelişimine katkı sağlar. Yine şekil 2.3.E'de gösterildiği gibi bozulan BMAL1-CLOCK transkripsiyon ağı sonucunda PER2 azalmasıyla, tümör baskılayıcı olan p53'ün çekirdeğe transloke olması engellenir. Bu durum p53'ün görevini yerine getiremeyerek kanser metabolizmasına katkı sağlamasına neden olur(6).



Şekil 2.3. Tümör ve otonom sirkadiyen saat(6)

Hücrelerde kromatin yapı üzerindeki DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik düzenlemeler ile genlerin ifadeleri kontrol edilir. Epigenetik mekanizmalardan biri olan DNA metilasyonu üzerinde son yıllarda oldukça çok çalışılmaktadır. DNA metilasyonu, sitozin (C) bazının 5. karbonuna metil grubu (-CH₃) takılması sonucunda 5-metil sitozinin (5m-C) oluşmasıyla kovalent modifikasyon olarak ifade edilir. Bu olay genomda CpG adalarının yoğunlaştığı alanlarda gerçekleşmektedir. Evrimsel olarak korunmuş olan CpG adaları sıklıkla genlerin promotör bölgelerinde bulunur(53). DNA metilasyonu memelilerde embriyonik gelişim, X kromozom inaktivasyonu, genomik imprinting gibi önemli biyolojik olaylarda görev alır. Kanser hücrelerinde metilasyon değişiklikleri oldukça sık görülmektedir. Bu değişiklikler 'tüm genom hipometilasyonu' ve 'bölgesel hipermetilasyon' olarak iki sınıfa ayrılabilir. Tüm genom hipometilasyonu, genomdan 5-metil sitozin yapısının azalması olarak tanımlanabilir ve genellikle Alu, LINE-1 gibi tekrarlayan genom dizilerinde görülür. Hipometilasyon genellikle tüm kanserlerde görülmekle birlikte hücrede oluşum itibari ile genomik dengesizlik yaratırlar. Bu durum kanserin ilerlemesine katkı sağlar. Ayrıca tümör baskılayıcı genlerin baskılanmasında metilasyon olayı görev yapar. Yapılan çalışmalar ile birçok kanser türünde tümör süpresör genlerin promotör bölgelerinin hipermetilasyonu gösterilmiştir(54). Sirkadiyen genlerin kanser gelişiminde rol oynayan saat kontrollü genleri düzenlemesi bağlamında saat genlerinin susturulmasının kanser gelişiminde rol aldığı düşünülmüştür. Tablo 2.1'de gösterildiği gibi *BMAL1* geni promotör bölgesinde oluşan hipermetilasyon olayı Over kanseri, akut lenfoblastik lösemi, Hodgkin dışı lenfoma, T hücreli akut lenfoblastik lösemi gibi hastalıklar ile ilişkilendirilirken, *CLOCK* geni promotör bölgesinde oluşan hipometilasyon meme kanseri ile ilgili bulunmuştur (55).

Tablo 2.1. Sirkadiyen saat genlerinin promotör bölgelerinde oluşan metilasyon düzenlemelerinin ilişkilendirildiği insan kanserleri(55).

HİPERMETİLASYON	
BMAL1	Over kanseri, akut lenfoblastik lösemi, Hodgkin dışı lenfoma, T hücreli akut lenfoblastik lösemi
CRY1	Meme kanseri, endometrial kanser, kronik lenfositik lösemi, hepatokarsinom
CRY2	Meme kanseri
PER1	Meme kanseri, endometrial kanser, hepatokarsinom, akciğer kanseri

HİPOMETİLASYON	
CLOCK	Meme kanseri
PER1	Servikal kanser, kolorektal kanser
PER2	T hücreli akut lenfoblastik lösemi
PER3	Kolorektal kanser
TIMLESS	Meme kanseri

2.1. Multipl Miyelom

Multipl miyelom monoklonal immünglobulin üreten klonal plazma hücrelerinin malignitesidir. Plazma hücreleri, B hücrelerinden farklılaşarak oluşur ve kemik iliğinde bulunur. Antikor üreterek humoral bağışıklıkta görev alırlar. Plazma hücreleri, içinde bulunduğu kemik iliği mikro ortamı (BMM) ile çok yakın ilişki kurarak çoğalır(56). Multipl miyelom hastalığı organ işlevlerinin bozulması ile ilerler. Bu bozulmalar: hiperkalsemi, böbrek yetmezliği, anemi ve kemik yıkımıdır (CRAB kriterleri olarak bilinir)(57). MM, tüm hematolojik malignitelerin %10'unu oluşturur. Hastalığın altında yatan nedenlerin belirlenmesi ve tedavi yaklaşımlarında ilerleme kaydedilmiş olsa da günümüzde MM tedavi edilemeyen hastalık olarak bulunmaktadır(58). Kök hücre uygulaması ve proteazom inhibitörleri ve immünomodülatör ilaçlar (IMiD'ler) dahil olmak üzere yeni terapötik ajanlar ile yüksek doz kemoterapinin kullanılmasına rağmen, MM hastalarının prognozu diğer hematolojik malignitelerden daha kötüdür. Bu nedenle hastalığın altında yatan genetik ve moleküler etkileşimler daha iyi anlaşılmalıdır(59).

Plazma hücrelerinin antikor oluşturması sırasında kullanılan DNA splicing mekanizması hataya açık ortam sunar ve malign dönüşüme yol açabilir. Hastalığın ilk aşaması olan Anlamı Belirlenemeyen Monoklonal Gamopati (MGUS), kemik iliğinde sınırlı miktarda malign plazma hücreleri içerir ve malignite öncesi evredir. Smoldering Multipl Miyelom (SMM) ise son organ hasarının olmadığı ancak kemik iliğindeki hücrelerin %10'dan fazlasının malign plazma hücresi olduğunda ortaya çıkar. SMM aksine MM'de son organ hasarı meydana gelir. Hastalığın son aşaması olan PCL(plazma hücresi lösemisi) ve EMD(ekstramedüller hastalık)'de ise miyelom hücresinin mikro çevreden bağımsız sinyal alarak kan dolaşımına sızması veya diğer organlarda bulunması ile tespit edilir(60,61). MM tedavi yaklaşımları arasında proteazom inhibisyonu, monoklonal antikorlar, alkilleyici ajanlar ve immün düzenleyici ajanlar sayılabilir. Ancak bu tedavi seçeneklerinden yararlanamayan MM hasta grubu da vardır(62). Yapısında taşıdığı çok

çeşitli genetik anormallikler ile heterojen bir hastalık olan MM tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi ve iyileştirilmesi için hastalığın altında yatan olaylar araştırılmaya devam etmektedir.

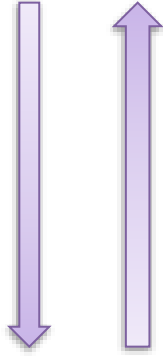
2.1.1. Multipl Miyelom Epidemiyolojisi

Küresel Kanser Gözlemevi (GLOBOCAN) 2018 yılında dünyada yaklaşık olarak 160.000 MM vakası olduğu ve MM'nin tüm kanserlerin %0.9'unu oluşturduğunu bildirmiştir. Tüm vakaların yaklaşık olarak 90.000'i erkek ve 70.000'ni kadınlardan oluşmaktadır. Tanı alma riskinin erkeklerde kadınlara göre göre yaklaşık 1,5 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir. Multipl miyelom insidansı dünyada 1990'dan 2016'ya kadar %126 artmıştır. Ayrıca Avustralya, ABD ve batı Avrupa'da MM insidansı daha fazladır. 2018 yılında dünyada MM hastalığından 106.000 kişinin öldüğü ve bu ölümlerin diğer kanser ölümleri içinde %1.1'lik kısmı oluşturduğu bildirilmiştir. Dünyada neoplazmaya bağlı olarak yaşanan ölümler 1990'dan 2016'ya kadar %94 artmıştır. ABD'de MM'den ölenlerin insidansı tüm kanserlerin %2.1'ini oluşturmaktadır. ABD'de multipl miyelom tanılarının %60 ve fazlası 65 yaşından fazla olanlara koyulurken, %15 ve altı 55 yaşın altındaki hastalara koyulmaktadır. MM'nin ortalama ölüm yaşı 75'tir. Bunun nedeni MM'de birikerek oluşan çok çeşitli mutasyonların zamanla klinik olarak görünür olmaya başlaması olarak açıklanabilir. MM, yaşlı yetişkinlerde, erkeklerde ve Afrikalı Amerikalılarda daha sık görülmektedir. Yeni tedavi yaklaşımlarının gelişmesi sonucunda ölüm oranı düşerek 5 yıllık sağkalım iki katından fazla artmıştır(63).

2.1.2. Multipl Miyelomda Sitogenetik Anomaliler

Plazma hücreleri (PC), kemik iliğinde B hücrelerinden farklılaşarak serum immünooglobulinleri üreten bağışıklık hücreleridir. Kemik iliği mikro ortamındaki malign hücrelerin çok aşamalı transformasyonu ile MM gelişir(56). MM'li hastaların sağkalım sonuçları ve tedaviye yanıtları oldukça heterojendir. Bunun nedeni hastalığın altında yatan karmaşık genomik düzensizliklerdir. Hastalığın altında yatan bu değişikliklerden kromozom 14q translokasyonları ve kromozom trizomileri birincil sitogenetik anormallikler olarak adlandırılırken, 17p delesyon ve 1q kromozomun duplikasyonu gibi olaylar ikinci sitogenetik anormalliklerdendir (Tablo 2.2). Çok aşamalı heterojen bir süreç olan miyelomagenез, hastalığın premalign evresi olan MGUS'tan başlayarak, SMM, MM ve PCL olarak ilerler. (64).

Tablo 2.2. Multipl miyelomda birincil ve ikincil anormallikler(64).

BİRİNCİL SİTOGENETİK ANOMALİLER		
TRİZOMİLER (~ %45)	Kromozom: 3,5,7,9,11,15 ve 21	<p style="text-align: center;">SİKLİN DÜZENSİZLİĞİ</p>  <p style="text-align: center;">MYC DÜZENSİZLİĞİ</p>
IGH TRANSLOKASYONLARI (~ %55)	<p>4q32'de IgH gen lokusunu içeren translokasyonlar:</p> <p>t(4;14);4p16;FGFR3-MMSET</p> <p>t(14;16);16q23;MAF</p> <p>t(14;20);20q12;MAFB</p> <p>t(8;14);8q24;MAFA</p> <p>t(11;14);11q13;CCND1</p> <p>t(6;14);6p21;CCND3</p>	
İKİNCİL SİTOGENETİK ANOMALİLER		
MONOZAMİLER	<p>Kromozom 13</p> <p>Kromozom 17</p> <p>Kromozom 14</p>	<p>TEKRARLAYAN MUTASYONLAR</p> <ul style="list-style-type: none"> • KRAS • NARS • TP53 • DIS3 • FAM46C • BRAF • TRAF3 • ROBO1 • CYLD • EGR1 • SP140 • FAT3 • CCND1
DELESYONLAR	<p>Kromozom 17p</p> <p>Kromozom 1p</p>	
AMPLİFİKASYONLAR	Kromozom 1q	
DİĞER GENOMİK DEĞİŞİKLİKLER	miRNA	

2.1.2.2. Multipl Miyelomda Birincil Sitogenetik Anomaliler

Miyelom gelişimindeki ilk adım lenf düğümlerinde G0/G1 fazında uyku halinde bulunan hafıza B hücrelerinin bir büyüme avantajı kazanılması olmalıdır. Bu avantajlardan ilki 14q32'de immüoglobulin ağır zincir (IgH) lokusunu içeren tekrarlayan translokasyonlar ile sağlanır. 14q translokasyonları vakaların %50'sinde gerçekleşir. En sık tekrarlayan kromozomal translokasyon % 15-20 oranında gözlenen t(11;14)(q13;q32), ardından% 12-15 prevalans ile t(4;14)(p16;q32)'dir. t(11;14)(q13;q32) içeren miyelom hücrelerinde siklinD1 geni (CCDN1), t(6;14)(p21;q32) taşıyan MM hücrelerinde siklinD3 geni (CCND3) düzensizleşerek aşırı transkripsiyona uğrar. t(4;14)(p16;q32) translokasyonu, histon metiltransferaz MMSET'in düzenlenmemesiyle sonuçlanır ve bu da H3K27me3 ve H3K36me2 seviyesinde bir artış yaratarak siklin D2'nin aşırı ifadesine neden olur. Translokasyon(4;14) ayrıca MAPK yolunu aktive eden FGFR3'ün ekspresyonuna neden olur. Plazma hücrelerinin MGUS'a dönüşürken kazandığı ikinci avantaj ise hiperdiploidilerdir ve MM hastalarının %45'inde görülür. En yaygın hiperdiploidi (yaklaşık% 30) olan trizomi 11, gen dozajındaki bir artış nedeniyle siklin D1'in aşırı ifadesine neden olur(59). Hastalığın ön başlatıcıları olan IgH translokasyonları ve hiperdiploidiler doğrudan ya da dolaylı olarak siklin D1, siklin D2 ve siklin D3'ün yukarı akış düzenlenmesine neden olur. Bu siklin çeşitleri CDK4/6 (siklin bağımlı kinaz) ile kompleks oluşturarak, RB'nin transkripsiyon faktörü olan E2F'den ayrılmasına yol açar. Bu olay E2F'yi inhibe olmaktan kurtararak hücreyi G1/S kontrol noktasından geçiren genlerin transkripsiyonuna katkıda bulunulmasını sağlar(61).

Tablo 2.3. Multiple miyelom için risk sınıflandırma modellerine göre her sitogenetik anormallik için prognoz(65).

	mSMART	IFM	IMWG
t(11;14)	Standart risk		
t(4;14)	Orta risk	Yüksek risk	Yüksek risk
t(14;16)	Yüksek risk		Yüksek risk
Del(17p)	Yüksek risk	Yüksek risk	Yüksek risk
Del(13q)	Orta risk		
1q kazancı	Yüksek risk		

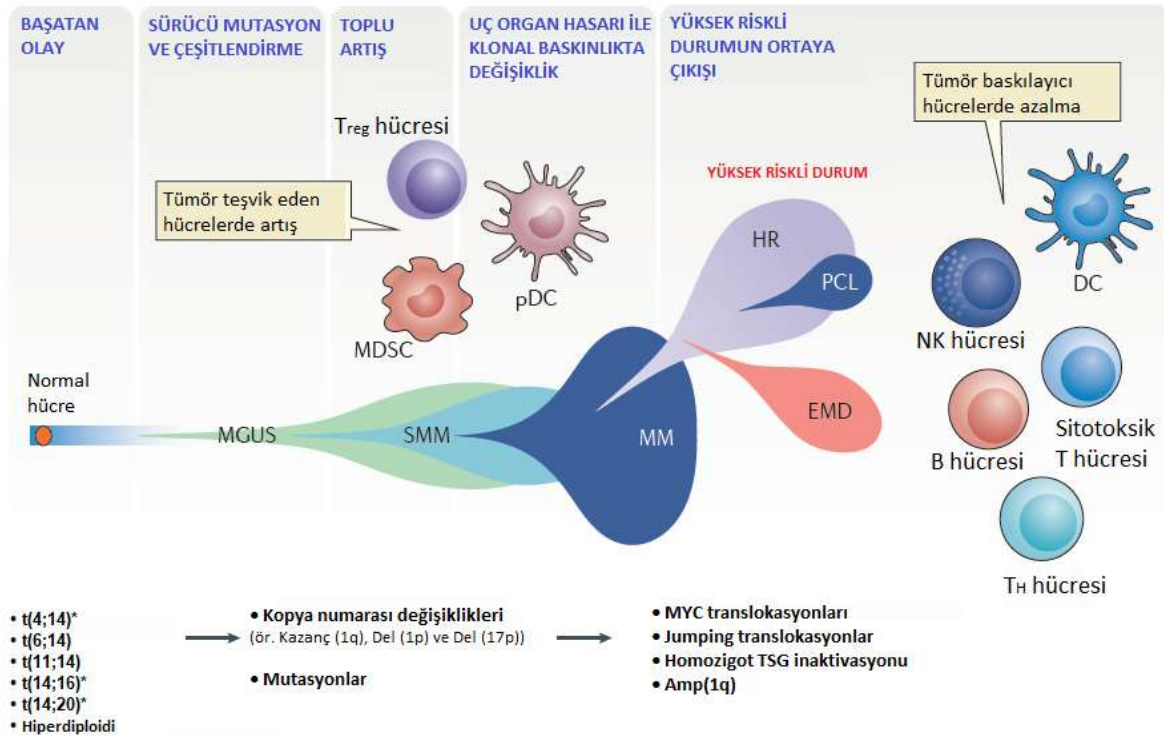
2.1.2.3. Multipl Miyelomda İkincil Sitogenetik Anomaliler

İkincil sitogenetik bozulmalar arasında kromozom 13,17,14 monozomileri, delesyonlar, koromozom 1q amplifikasyonu vardır(64). Kopya sayısı anormallikleri sonucunda kromozomal kayıp ya da kazançlar oluşur. Kromozomun kısa (p) ya da uzun (q) kolundaki delesyonlar sonucunda tümör baskılayıcı genlerin kaybına neden olur. Bu durum malign plazma hücrelerin büyüme avantajı sağlamasına neden olur. del(1p), CDKN2C, FAF1 ve FAM46C'nin, del(11q) BIRC2 ve BIRC3'nin, del(13q) RB1 ve DIS3'ün, del(17p) TP53'ün kaybıyla sonuçlanır. Hastaların yaklaşık %40'ında görülen kromozom 1'in uzun kolundaki kazanç ise genellikle t(4;14) ile birlikte bulunur. Somatik mutasyonlar en sık RAS/MAPK yolunun genlerinde meydana gelir; hastaların yaklaşık %50'sinde görülür. Somatik mutasyon oranları KRAS %22, NRAS %17, BRAF %8 şeklindedir. Bu genlerdeki mutasyonlar, kanser hücrelerinde bazı sitokinlerin bu yoldan sinyal gönderebildiği MEK-ERK sinyal yolunun aktivasyonuna yol açabilir. Bu durum MM'de hücre büyümesinde avantaj sağlanması için önemli bir olaydır. Etkilenen diğer sinyal yolları arasında NF-κB yolu ve PI3K bulunur(57,66). MYC translokasyonları, RAS yolu düzensizlikleri ve 1q amplifikasyonu gibi sekonder olaylar da SiklinD-CDK aktivitesine neden olarak hücre çoğalmasına katkı sağlar(61).

MYC translokasyonları MM'nin %15'inde ve daha ileri evrelerin %50'sinde görülür. MYC'nin aşırı ekspresyonu hastalık hakkında kötü prognoz ile ilişkilidir. Yine RAS gen ailesi (NRAS ve KRAS) en sık görülen mutasyonlardan biridir ve prevalansı %20-35 arasındadır. Yine bu gen ailesi de hastalığın kötü gidişatını arttırmakta ve genel sağ kalım oranını azaltmaktadır. MM'nin ileri evrelerinde görülen 17p delesyonu, tümör baskılayıcı gen olan TP53'ün mutasyonuna neden olur ve sonucunda hastada sağkalım oranı kısalmıştır. Yapılan bir çalışmada hem 17p hem P53 mutasyonlarının delesyonuna sahip hastalar, bir kromozom anormalliği olan hastalara göre daha kısa sağkalım oranına sahiptir. Hastalığın MM'ye ilerlemesi RAS mutasyonu, MYC aşırı ekspresyonu ve 1q21'in amplifikasyonu ile ilişkilidir. Yaygın hücre anormalliklerden biri olan 1q21 amplifikasyonu, *de novo* hastaların yaklaşık %40'ında ve MM'nin %70'inde ortaya çıkmaktadır. Bu anormalliğe sahip hastalar yüksek riskli grupta yer alır ve uygulanan tedavilere düşük yanıt verme eğilimindedirler. 1q21 amplifikasyonu sonucu hastalığı tetikleyen bazı aday onkogenler bulunmuştur. Bunlar BCL9, MCL-1, ILF2, ILGR, CKS1B genleridir. 1q21 amplifikasyonu sonucunda eş zamanlı birkaç genin aşırı ekspresyonu gerçekleşerek hücre içinde genetik kararsızlık artar ve hastalığın kötü gidişatına katkı sağlanmış olur. Böylece hastaların sağ kalım oranı kısalmıştır(67,68).

MCL-1 ve BCL-2 apoptotik yolda görev alarak çalışan genlerdir. MCL-1 ve BCL2'nin aşırı ekspresyonu birçok kanserde görülmekte olup apoptotik direnç sağlamaktadır. CKS1B hücrenin çoğalmasında rol oynayan bir protein kinaz düzenleyici alt birimdir. CKS1B'de MM hastalığında aşırı ekspresyona uğrar ve mitotik aktivitenin artmasına neden olur. CKS1B, STAT3 ve MEK/ERK

sinyal yollarını tetiklemesi yolu ile hastalığın tedavisinde kemoterapötik ajanlara direnç sağlar. ILF2'nin aşırı ekspresyonu sonucunda genomik kararsızlıklara karşı direncin artar ve malign plazma hücrelerinin hayatta kalması uzar. BCL9 da 1q21 kromozomunda yer alır ve Wnt yolunun elemanlarından biridir. Wnt/beta katenin yolunun düzensizliği birçok malignitenin gelişimine katkı sağladığı gösterilmiştir. Yukarıda bahsedilen bu genlerin 1q21 amplifikasyonu taşıyan hastalarda hedeflenmesi tedavi için başka bir seçenek oluşturur. MM patogenezinde önemli rolü olan IL-6, doğrudan PI3K'yı tetikleyerek RAS/MAPK yolunu aktive edebilir(56,68).



Şekil 2.4. Genetik anormallikler ve mikroçevre etkisi ile plazma hücrelerinin MM ve yüksek riskli hastalığa ilerlemesi(61)

2.1.3. Multipl Miyelomda Kemik İliği Mikro Ortamı

Hematopoietik kök hücrelerinin(HSC'ler) gelişimi için gerekli olan bileşenler kemik iliği mikro ortamında mevcuttur. Kemik iliği mikro ortamı genel olarak hücreler, hücre dışı matris ve çözünür kısımdan oluşur. Hemotopoez, kemik iliği mikro ortamında bu bileşenlerin dengesi ile korunur. Tümör hücresinin gelişiminin altında yatan mekanizma genetik anomaliler olsa da kemik iliği mikro ortamı sahip olduğu özellikler nedeniyle malign dönüşümüne katkı sağlar. Kabaca kemik iliği mikro ortamı mezenkimal hücreler, osteoblastlar ve osteoklastlar ile bazı immün düzenleyici hücrelerden oluşur. Kemik iliğinde IL-6, BAFF, APRIL, CSF1, FGF-2, anjiyotensin-1, RANK, VEGF gibi bir takım sitokinler ve uyarıcı maddeler MM'nin çoğalmasını ve direncini arttırabilir. Ayrıca plazma hücreleri çoğalmak için İNOS-cGMP sinyali, c-MYC, Src ve ERK gibi kinazları olarak kullanılabilir. Reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen maddelerini (RNI) içeren bir kemik iliği mikro ortamı genomik kararsızlığa katkı sağlayabilir ve hareketsiz klonları seçebilir(56,69).

Mezenkimal kök hücreler (MSC'ler), kendi kendini yenileme, tümör hedefleme ve bağışıklık düzenleme gibi işlevleri nedeniyle hematopoetik kök hücreleri düzenlerler. Bazı hematolojik kanserlerde MSC'ler oldukça düzensizdir ve hastalığın ilerlemesine katkı sağlar. Örneğin MM'den alınan MSC'ler, bazı sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin ekspresyonunu değiştirerek miyelom hücrelerinin ilaçlara karşı direncini arttırır(56).

Osteoblastlar (OB'ler) kemik oluşumunu sağlarken osteoklastlar (OC'ler) kemik yıkımında görev alırlar. Normal kemik yapısının oluşması ve şekillenmesi OB'ler ile OC'ler arasında dengeye bağlıdır. İlk olarak RANKL ve MIP-1a 'nın aracılık ettiği osteoklast oluşumu MM'de kemik hasarına neden olmaktadır. Osteoblastlardan salınan decorin apoptozu indükleyerek MM'nin hayatta kalmasını engeller. MM hastalığında osteoblastların gelişimi önemli ölçüde azalır ve osteoklastlar hastalıkta daha etkin olurlar. MM'de OC'ler oldukça fazla aktivasyon gösterirler. Bu bağlamda kemik dokunun parçalanması ile salınan kalsiyum, büyüme faktörleri ve diğer maddeler tümör büyümesine katkı sağlar(56,70).

Kemik iliğiyağı (BMF), kemik iliği mikro ortamında hastalığın ilerlemesi ile kaybolduğu gözlemlendiğinden bu bize adipositlerin hastalığın ilk evrelerinde rol alabileceğini düşündürmektedir. Adipositlerin ürettiği yüksek miktarda adinopektin seviyeleri MM büyümesini ve anjiyogenezi azaltır. Ayrıca adipositler tarafından salınan rezistin MM hücrelerini apoptozdan korumaktadır(56).

Stromal hücreler ve osteoblastlar tarafından üretilen sitokinlerin ürettiği IL-6, SDF1, MIP1, IL-10, IGF-1, VEGF ve HGF gibi büyüme faktörleri MM gelişimi açısından oldukça önemlidir. IL-6, pRB'nin fosforilasyonu yolu ile MM'nin çoğalmasında önemli rol alır. MGUS'tan MM'ye ilerledikçe serum IL-6 miktarı artar ve bu durum kötü prognoz ile ilişkilidir. Ayrıca IL-6 dentritik hücrelerde HLA-DR, CD40, CD80 gibi düşük antijen oluşumu nedeniyle T hücrelerinin etkinliği azalarak bağışıklık sistemine zarar veririr. GC3F'de IL-6 gibi bazı sinyal yollarını değiştirerek tümör büyümesini uyarır. IL-10 da bağışıklık sistemini etkileyerek tümör büyümesini ve anjiyogenezi arttırır. Sonuç olarak hem MM hem de kemik iliği mikro ortamı tarafından üretilen bu sinyaller MM gelişimine katkı sağlar(56,71).

Sirkadiyen saat mekanizmasının birçok kanser türüyle ilişkili olduğu bilinmekte fakat kanser metabolizmasındaki rolü tam olarak aydınlatılmamıştır. Multipl miyelom ise transformasyon sürecinde çok fazla genetik anormalliklerin birikmesiyle oluşmuş heterojen bir hastalıktır. Multipl miyelom için bazı tedavi seçenekleri uygulansada bazı kötü prognozlu hastalıklar bu tedaviye cevap verememekte ve günümüzde MM tedavi edilemez bir hastalık olarak var olmaya devam etmektedir. Bu çalışmada sirkadiyen ritim düzenleyicileri olan *BMAL1* ve *CLOCK* genlerinin Multipl Miyelom hastalığının gelişimindeki rolü araştırılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Hasta Seçimi ve Örneklerin Toplanması

Çalışmada, 2019 yılında başlayan iki yüksek lisans tez projesi kapsamında etik onayı alınan projeye ait hasta ve kontrol örnekleri kullanılacaktır. Örnekler Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı'nda MM tanısı almış 59 hastadan alınan kemik iliği örnekleridir.

3.1.2. Dahil Olma/Olmama Kriterleri

Hasta Grubu:

- 1- 18-75 yaş aralığında olmak
- 2- Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı'nda MM tanısı almış olmak
- 3- MM'a eşlik eden başka bir kronik hastalığa (Hematolojik diğer hastalıklar başta olmak üzere) sahip olmamak
- 4- Herhangi bir ilaç, bitkisel ürün, sigara ya da alkol kullanıyor olmamak
- 5- Çalışmamızda EDTA'lı kemik iliği kullanılacaktır. Hastaların bu örneği vermeye uygunlukları aspire edilecek kemik iliği miktarına göre rutin tanı testlerini (patolojik ve/veya sitogenetik vs.) aksatmayacak şekilde klinik tarafından belirlenecektir. Belirlenen bu koşula uygun olmak.
- 6- Hastanın, "Bilgilendirilmiş hasta olur formun" u okumuş ve araştırmaya dahil olmayı imzası ile kabul etmiş olmak.

Kontrol Grubu:

- 1- 18 yaşından büyük olmak
- 2- Belirlenen tanıya yönelik kemik iliği aspirasyon biyopsisi yapıp herhangi bir malignite tespit edilmemiş olmak
- 3- Hastanın, "Bilgilendirilmiş hasta olur formun" u okumuş ve araştırmaya dahil olmayı imzası ile kabul etmiş olmak.

Kontrol grubuna ait 12 bireye ait kemik iliği örneği ve RNA'ları daha önceki araştırmalardan sağlanmış olup elimizde mevcut olduğundan yeni örnek çalışmaya alınmayacaktır.

3.2. Kullanılan Araç-Gereç ve Malzemeler

3.2.2. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Ekipmanları

- ⊕ Mikrosantrifüj (Hettich Mikro 22 R, İngiltere)
- ⊕ Vorteks (VELP, İtalya)
- ⊕ Derin Dondurucu (Arçelik 2031D, Türkiye)
- ⊕ Buzdolabı (Arçelik 8188 NF)
- ⊕ Real-Time PCR (ABI 7500, Applied Biosystems, ABD)
- ⊕ Real-Time PCR Plate için Film, Applied Biosystems, ABD
- ⊕ Real -Time PCR Plate tutucu (Applied Biosystem, N8010560, ABD)
- ⊕ Mikropipet Seti (Eppendorf, Almanya)
- ⊕ Buzdolabı (Arçelik 8188 NF, Türkiye)
- ⊕ 1.5 ml'lik eppendorf tüpleri
- ⊕ Pipet ucu 500 µl'lik (Starlab, S1605-0001, Almanya)
- ⊕ Pipet ucu 200'lik (Starlab, S1111-0006, Almanya)
- ⊕ Pipet ucu 10µl'lik (Starlab, S1110-3000, Almanya)
- ⊕ Pipet ucu 500 µl'lik (Starlab, S1605-0001, Almanya)
- ⊕ Pipet ucu 200'lik (Starlab, S1111-0006, Almanya)
- ⊕ Pipet ucu 10µl'lik (Starlab, S1110-3000, Almanya)
- ⊕ Mikrosantrifüj Tüpü 1.5 ml'lik (Starlab, S1605-5500, Almanya)
- ⊕ Mikrosantrifüj Tüpü 0.5 µl'lik (Starlab, S1605-0000, Almanya)

3.2.3. Kullanılan Kimyasallar ve Saf Malzemeler

- ⊕ 2 xTaqManUniversal PCR Master Mix (5ml) (Applied Biosystem, 4304437, ABD)
- ⊕ 5x Reaksiyon tamponu RT-PCR
- ⊕ 2mM dNTPs mix 1ml (Thermo Scientific, R0192, ABD)
- ⊕ RevertAid™Reverse Transkriptase (200U/µl) (Thermo Scientific, #EP0441,ABD)
- ⊕ Ribolock RNase Inhibitor (40 U/µl)(Thermo Scientific, #E00381, ABD)
- ⊕ Ribozol (Amresco, N580, Kanada)
- ⊕ Kloroform: izoamilalkol (24:1) (Ambresco, X205, ABD&Kanada)
- ⊕ İzopropanol (C₃H₈O)(Sigma, I9556, ABD)
- ⊕ SF Steril Distile Su (Polifarma, Türkiye)

- ⊕ %80'lik Etanol (C₂H₆O)(Merck, 100983, Almanya)
- ⊕ Primer ve proplar

3.3. Kemik İliği Örneklerinden Total RNA Eldesi

Gönüllülerden EDTA'lı tüplere alınan 3-4 ml kemik iliği örneklerinden, guanidyum isotiyosiyonat/fenol kloroform izolasyon yöntemi kullanılarak total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. RNA elde edilene kadar örnekler - 80°C'de muhafaza edildi. Deneyin aşamaları tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Total RNA eldesi deneyinin aşamaları

1.	200 µl EDTA'lı kemik iliği örneği 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi. Üzerine 500 µl ribozol eklenip vorteksenerek 15 dk buz içerisinde inkübe edildi.
2.	İnkübasyon sonrası örnekler üzerine +4°C'de muhafaza edilen 200 µl kloroform: izoamilalkol (24:1) eklendi ve hemen vortekslendi.
3.	Mikrosantrifüj tüpleri +4°C'de 14.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
4.	Örnekler santrifüj sonrası üstte açık sıvı fazda RNA, orta kısımda beyaz bulutumsu fazda DNA ve alttaki kırmızı fenol fazda protein olmak üzere üç faza ayrıldı.
5.	RNA'nın bulunduğu üstteki faz, pipet yardımıyla alınarak etiketli tüplere transfer edildi.
6.	Üzerine 500 µl hacimde izopropanol eklendi ve RNA'yı çöktürmek için 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.
7.	Tüpler +4°C'de 10 dk 14.000 rpm'de santrifüj edildi.
8.	Süpernatant, pelletin altüst olmamasına dikkat edilerek pipetle atıldı.
9.	Pellet üzerine 1 ml hacimde %80'lik soğuk etanol ilave edilerek RNA'nın yıkanması sağlandı. Sonrasında, tüpler +4°C'de 10 dk. 14.000 rpm'de santrifüj edildi.
10.	Süpernatant atıldı ve etanolün kalmamasına dikkat edilerek kuruma için 10-15 dk inkübe edildi
11.	RNA pelletinin çözünmesi için üzerine 50 µl distile su ilave edildi. 15 sn kadar vorteks yapıldı ve oda sıcaklığında 10 dk. bekletildikten sonra tüpler -20°C'de saklandı.

3.4. RNA Örneklerinin Spektrofotometrik Analizi ve cDNA Sentezinde Kullanılacak RNA Kalıp Miktarlarının Belirlenmesi

RNA örneklerinin saflık ve miktar tayini (optik dansite ölçümleri) Nanodrop spektrofotometre cihazı (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) kullanılarak yapıldı. Örneklerin A260/A280 oranlarının 1.7-2 arasında olmasına dikkat edildi. cDNA sentezinde kalıp olarak kullanılacak RNA miktarları, her bir örnek için, toplam 50µl'lik reaksiyon volümü içinde 2µg/µl olacak şekilde hesaplandı ve reaksiyon karışımına eklendi. Bu yolla, bütün örnekler için eşit miktarlarda RNA'nın kullanılması ile cDNA sentezlenmesi ve örneklerdeki gen ekspresyon farklılıklarının kalıp RNA miktarlarındaki değişkenlikten kaynaklanmaması sağlandı.

3.5. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

cDNA sentezi öncesinde tüm RNA örneklerinin miktar tayinleri (O.D.280nm'de spektrofotometrik yöntemle) yapılarak saflık oranları belirlendi. Miktar ve saflık oranları cDNA eldesine uygun olan RNA'lardan cDNA sentezi standart protokole göre yapıldı. Sentez için kullanılacak RNA kalıp miktarı her bir örnek için 2µg/µl olacak şekilde ayrı ayrı hesaplandı. RNA kalıp, Reverse Tanskiptaz ve ölçüm yapılacak genlerin primerleri kullanılarak 5 µl' lik reaksiyon karışımı oluşturuldu. Bu sayede örnekler arasındaki RNA konsantrasyon ve ekspresyon düzeyi farkları normalize edildi. Uygulamanın karışımları ve koşulları aşağıdaki gibidir:

- 1- Tablo 3.2' deki miktarlar baz alınarak 2000 µl' lik reaksiyon tüpünde 1. Karışım (reaksiyon karışımı) hazırlandı ve 10 dk -20°C'de bekletildi.

Tablo 3.2. cDNA reaksiyonu için 1. Karışım

	Her Bir Hasta Ve Kontrol İçin Eklenecek Miktar
<i>dNTP 10mM</i>	1,5µl
<i>5XBuffer (Tampon)</i>	3 µl
<i>RNaz İnhibitör 40 U/µl</i>	0,1 µl
<i>RT primer</i>	0,2 µl
<i>Revers Transkriptaz 20 U/ µl</i>	0,25 µl
<i>TOPLAM</i>	5 µl

- 2- Tablo 3.3'deki miktarlara göre total hacim 15 µl olacak şekilde her bir hasta ve kontrol için 500 µl'lik reaksiyon tüplerine konuldu ve 5 dk kadar 90°C'de etüvde bekletildi.

Tablo 3.3. cDNA reaksiyonu için 2. karışım

	Her bir hasta ve kontrol için eklenecek miktar
Reaksiyon karışımı	5 µl
RNA kalıp	2µg/µl
dH2O	10 µl - Kalıp RNA miktarı
TOPLAM	15 µl

- 3- 2000 µl'lik reaksiyon tüpünde hazırlanan karışım, içerisinde, su ve kalıp RNA bulunan tüplere eşit miktarda (5 µl) dağıtıldı ve her bir reaksiyon tüpünde son hacim 15 µl oldu.
- 4- cDNA reaksiyon tüpleri, 37°C'de 60 dk, 95°C'de 5 dk olacak şekilde thermal cycler cihazında inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi. Örnekler, Real-time PCR uygulamasına kadar -20°C'de bekletildi.

3.6. Real-Time qPCR ile Gen Ekspresyonu Analizi

qPCR işlemleri, ABI Prism 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)" cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Tablo 3.4'e göre her gen için ayrı ayrı karışım hazırlandı. qPCR sonuçları kantitatif- komperatif Ct ($\Delta\Delta Ct$) yöntemi ile SDS 2.0. 6 software(Applied Biosystems) kullanılarak değerlendirildi. Her bir gen için kullanılan primer ve florojenik ZNA™ problar (Metabion International AG) Primer ekspres 3.0 programı (Applied Biosystems) kullanılarak dizayn edildi. Primer ve prob dizileri tablo 3.4' da verilmektedir. Real-time-PCR, dört aşamada gerçekleşebilir:

- I. Doğrusal düzlem fazı (linear ground phase)
- II. Üssel faz (exponential phase)
- III. Logaritmik doğrusal faz (log-linear phase)
- IV. Plato fazı (plateau phase)

Tablo 3.4. qPCR analizinde kullanılan miRNA primer ve prob dizileri

Gen Adı	Gen ID	NCBI REFERANS NUMARASI	Primer/probe sekansı
<i>BMAL1</i>	406	NR_147790.2	R: 5'-CATATTCCATAGATTTACACCTGATTT-3' F: 5'-CGCAATTGGACGACTGCAT-3' PR: 5'-FAM-CTCATGTAGTTCCACAACCAAGTGAACGGG-BHQ-1-3'
<i>CLOCK</i>	9575	NM_001267843.2	R: 5'-AATCTTATCTGCCTGCTCCTGAGTGA-3' F: 5'-GCAGCCGGAAGCATGGT-3' PR: 5'-FAM-CCATCTAGTATGCCACAAAACAGCACCCA-BHQ-1-3'

Kullanılan problemlerin 5' ucunda Fam işaretli florasan boya, 3' ucunda ise bu ışımının dalga boyu ile aynı dalga boyuna sahip ve ışımının yayılmasını engelleyen soğurucu (quencher) Black Hole Quencher TM (BHQ) bulunmaktadır. Primer içindeki sitozinler yerine C-5 propinil-deoksiribo sitozin (pdc) kullanılarak Tm değerleri arttırılmıştır. Ayrıca problemler sentezlenirken kullanılan sıkıştırılmış nükleik asitler (zip nucleic acids- ZNA) ile de Tm değeri artışı yoluyla hedefe bağlanma özgünlüğü arttırılmıştır.

Çalışmada endojen kontrol olarak B Aktin, kantitasyon sırasında referans RNA olarak ise TaqMan Human RNA (50ng/ µl) (Applied Biosystems) kullanıldı. Her bir genin ekspresyon analizi için toplam reaksiyon volümü 25 µl olacak şekilde belirlendi. Reaksiyon karışımı Tablo 3.5.' te verilmektedir.

Tablo 3.5. Real-time-PCR gen ekspresyonu için kullanılan solüsyonlar ve miktarları

	Miktar
<i>cDNA kalıp</i>	5 µl
<i>2 x TaqMan Universal PCR master mix</i>	12,5 µl
<i>Primer F</i>	900 nmol
<i>Primer R</i>	900 nmol
<i>TaqMan®Prob</i>	200 nmol

Reaksiyon karışımına eklenecek prob miktarı BMAL1 ve CLOCK için ayrı ayrı belirlendi ve reaksiyon karışımına eklendikten sonra kalan hacim dH₂O ile tamamlandı. Her bir örnek için ayrı ayrı hazırlanan qPCR reaksiyon karışımları 96 kuyucuklu plate'teki bölümlere alındı. Plate'in üst kısmı film (MicroAmp Optical Adhesive Film) ile kaplandı. Daha sonra plate perfect spin ile

santrifüj yapıldıktan sonra cihaz içindeki ısı bloğuna yerleştirildi. 50°C'de 2 dk pre-inkübasyondan sonra, 95°C'de 10 dk ve döngü evresinde 50 döngü 60°C'de 15 sn, 60°C'de 90 sn olacak şekilde Real-time PCR (ABI 7500, Applied Biosystem) işlemi gerçekleştirildi.

3.7. qPCR Verilerinin Analizi

Hasta ve kontrol gruplarının gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasında göreceli kantitatif değerlendirme yöntemi kullanıldı. Yöntemin temeli, analiz edilen her bir gen ekspresyon düzeyinin (Ct değeri) hasta ve kontrol gruplarındaki kat değişiminin belirlenmesine dayanmaktadır. Real-time-PCR ile gen ekspresyon tayininde hedef gen için hem kontrol hem de hasta örnekleri uygun bir housekeeping veya referans gen ile normalize edilir. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi, olarak adlandırılan bu yöntemin formülasyonu:

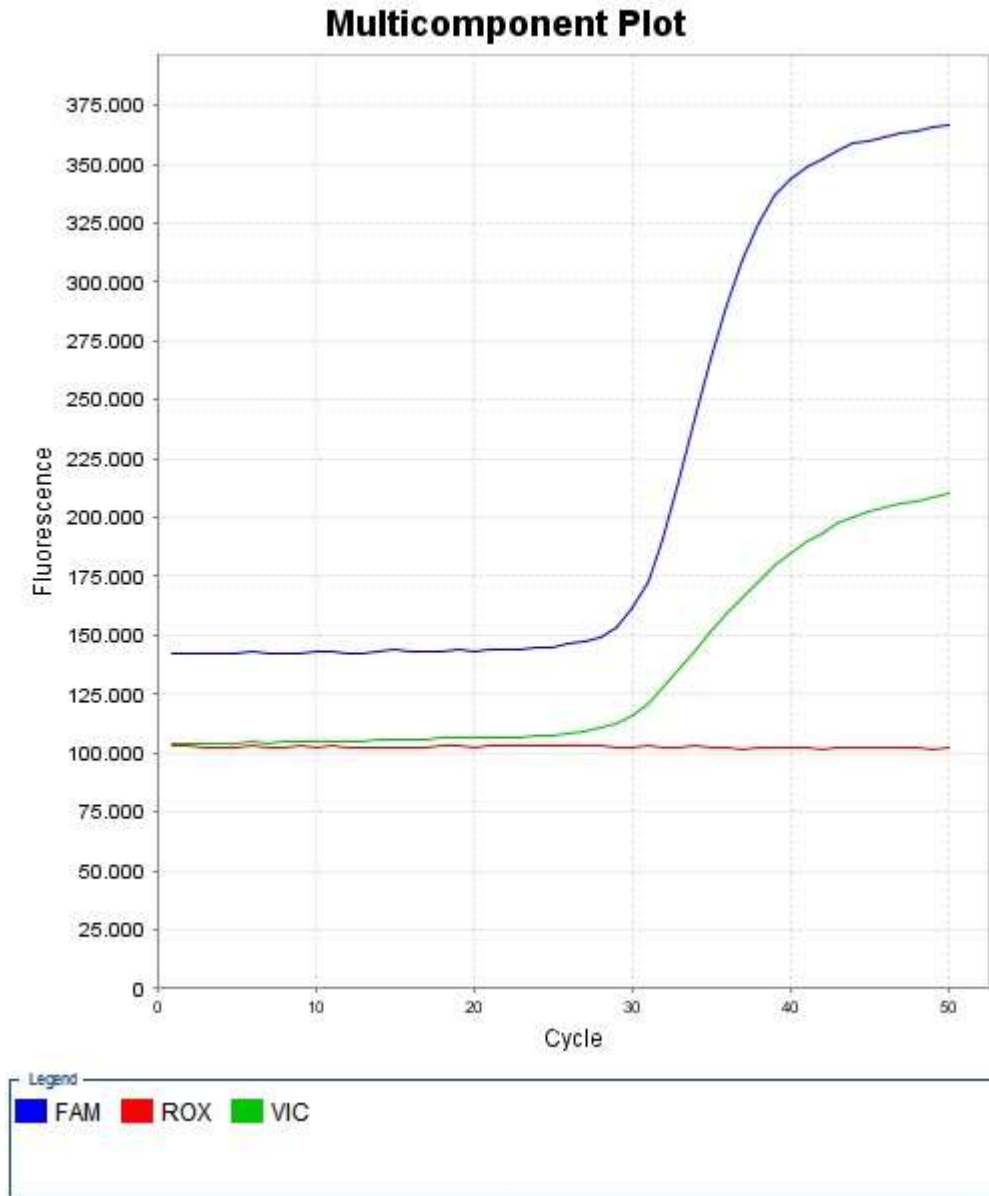
$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta\Delta Ct \text{ örnek} - \Delta\Delta Ct \text{ kontrol})}$$

$$\Delta Ct (\text{örnek}) = Ct \text{ hedef gen} - Ct \text{ referans gen}$$

$$\Delta Ct (\text{kontrol}) = Ct \text{ hedef gen} - Ct \text{ referans gen}$$

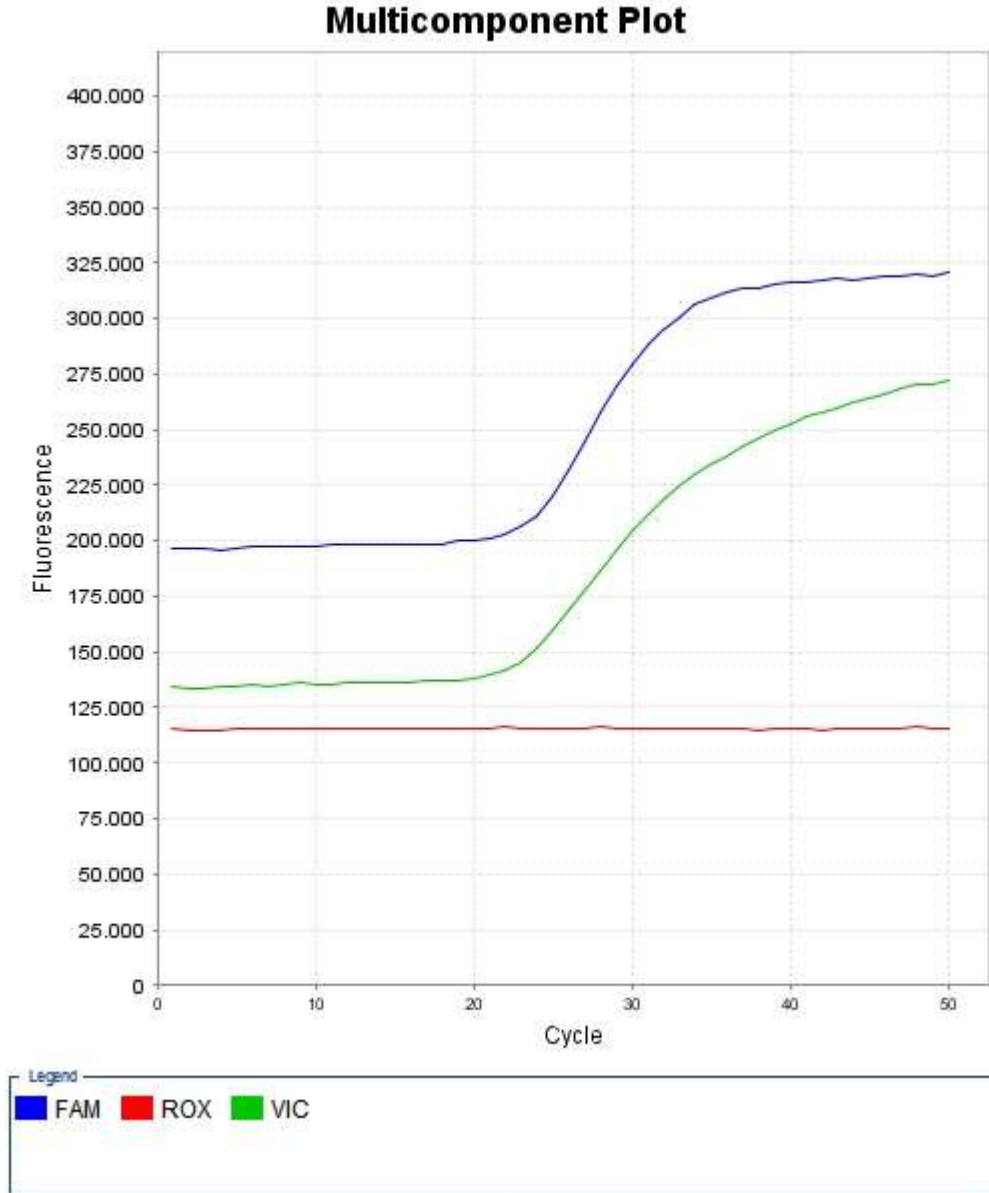
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{örnek}) - \Delta Ct (\text{kontrol})$$

şeklindedir. Çalışmamızda hedef gen ekspresyon değişimleri, SDS 2.0.6 yazılımı ile $\Delta\Delta Ct$ değerleri kullanılarak belirlendi (Şekil 3.1). Veri normalizasyonu için ise $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri hesaplandı.



Şekil 3.1. Multiple miyelom örneğinde BMAL1 ifadesinin Real-Time PCR görüntüsü.

(Mavi renkli 'FAM': BMAL1, Yeşil renkli 'VIC': ACTB, Kırmızı renkli 'ROX': referans boya)



Şekil 3.2. Multiple miyelom örneğinde *CLOCK* ifadesinin Real-Time PCR görüntüsü.

(Mavi renkli 'FAM': *CLOCK*, Yeşil renkli 'VIC': *ACTB*, Kırmızı renkli 'ROX': referans boya)

3.8. İstatistik

MM'de sirkaiyen düzenleyici *BMAL1* ve *CLOCK* gen Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması amacıyla yürütülen bu çalışmaya ait verilerin istatistiksel analizi Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'ndan danışmanlık alınarak yapıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk test istatistiği ile değerlendirilmiştir. Tanımlayıcı istatistikler vaka-kontrol ve cinsiyet için sayı (N) ve yüzde (%) şeklinde, yaş, *BMAL1* ve *CLOCK* gen ekspresyon düzeylerine ait değerler için min, max, medyan [Q1-Q3] ve mean±sd

şeklinde verilmiştir. Vaka ve kontrol grupları arasında cinsiyet dağılımı arasındaki ilişki Ki-Kare test istatistiği ile değerlendirilmiştir. Cinsiyet ile vaka-kontrol grupları arasındaki yaş ve gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasında Student t test istatistiği kullanılmıştır. Cinsiyete ve vaka-kontrol grubuna göre yaş ile BMAL-1 ve CLOCK gen ekspresyon düzeylerine ait değerler arasındaki ilişki analizi için Pearson korelasyon yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen tüm sonuçlar $p < 0.05$ durumunda anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Yaptığımız çalışmada MM tanısı almış 46 hasta ve 13 sağlıklı bireyden alınan kemik iliği örneklerinden oluşturulan gruplar arasında BMAL1 ve CLOCK gen ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak değerlendirildi.

4.1. Kontrol Ve Hasta Gruplarının Yaş Ve Cinsiyet Bakımından Değerlendirilmesi

4.1.2. Kontrol Ve Hasta Gruplarının Yaş Bakımından Değerlendirilmesi

Yaptığımız bu çalışmada hasta grubunda 47-91 yaş aralığında 46 birey, kontrol grubunda ise 22-80 yaş aralığında 13 birey olmak üzere toplamda 59 birey bulunmaktadır. Hasta bireylerin 19'unu (%41,3) kadınlar oluştururken, 27'sini (%58,7) erkekler oluşturmaktadır. Çalışmamızda yer alan MM hastalarının yaş ortalaması $64,98 \pm 9,88$, kontrol grubunun yaş ortalaması ise $62 \pm 14,6$ olarak hesaplandı. Hasta ve kontrol grupları arasında yaş ortalamaları bakımında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. ($p=0.394$) (tablo 4:1)

Tablo 4.1. Hasta ve kontrol gruplarının yaş ortalaması bakımından değerlendirilmesi (n=birey sayısı).

GRUP	MM (n=49) <i>ort±sd</i>	KONTROL (n=13) <i>ort±sd</i>	p
YAŞ	64,98±9,88	62±14,6	0.394

4.1.2. Kontrol Ve Hasta Gruplarının Cinsiyet Bakımından Değerlendirilmesi

Yaptığımız çalışmada hasta bireylerin 19'unu (%41,3) kadınlar oluştururken, 27'sini (%58,7) erkekler oluşturmaktadır. Kontrol bireylerinin 5'ini kadınlar (%38,5) oluştururken, 8'ini (%61,5) erkekler oluşturmaktadır. Hasta ve kontrol grupları arasında cinsiyet dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. ($p=0,854$) (tablo 4:2)

Tablo 4.2. Hasta ve kontrol gruplarının cinsiyet bakımından değerlendirilmesi (n=birey sayısı).

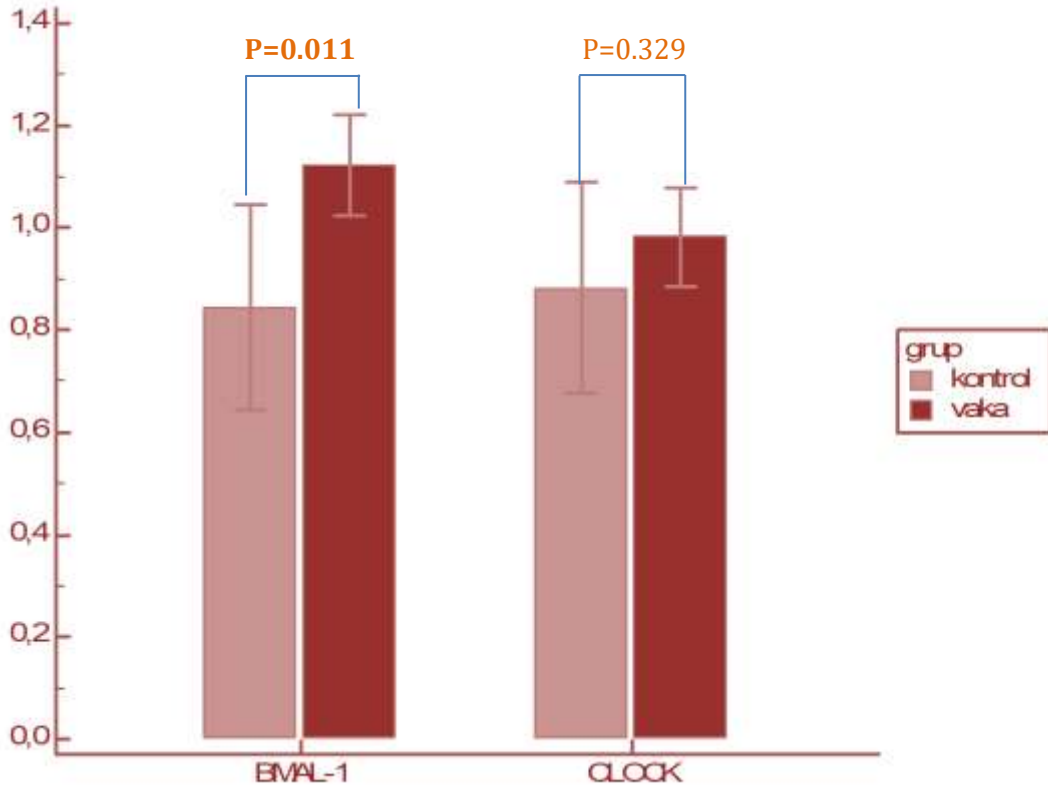
	MM n (%)	Kontrol n (%)	Total	p
Kadın	19 (%41,30)	5 (%38,50)	24 (%40,70)	0.854
Erkek	27(%58,70)	8 (%61,50)	35 (%59,30)	

4.2. Vaka Ve Kontrol Gruplarının Gen Ekspresyon Düzeyi Bakımından Değerlendirilmesi

Kanser gelişiminde rol oynadığı düşünülen iki sirkadiyen düzenleyici genin MM'deki ekspresyon seviyelerinin artış ve azalışının araştırılması bağlamında BMAL1 ve CLOCK'ın kontrol ve hasta gruplarındaki ekspresyon seviyeleri arasındaki farklılıklar değerlendirilerek p değerleri hesaplandı. Vaka ve kontrol grupları arasında BMAL-1 gen ekspresyon düzeyi değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır(p=0.011). Vaka ve kontrol grupları arasında CLOCK gen ekspresyon düzeyi değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (p=0.329). (tablo 4:3)

Tablo 4.3. Kontrol ve MM gruplarındaki gen ekspresyon seviyeleri bakımından değerlendirilmesi.

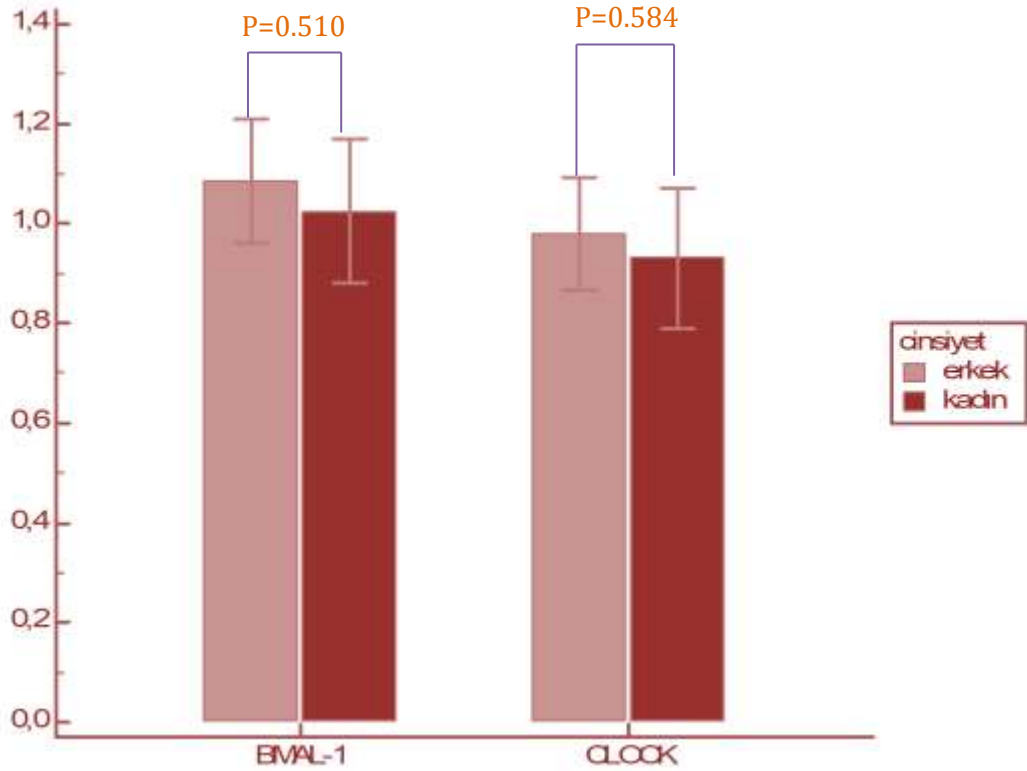
GRUP	MM (n=46) <i>medyan[Q1-Q3]</i>	KONTROL (n=13) <i>medyan[Q1-Q3]</i>	p
BMAL1	1,121±0,333	0,845±0,334	0.011
CLOCK	0,983±0,326	0,881±0,342	0.329



Şekil 4.1. Kontrol ve MM gruplarındaki gen ekspresyon seviyeleri bakımından grafiği.

4.3. Vaka ve Kontrol Grubunda BMAL1 ve CLOCK Ekspresyon Seviyelerinin Cinsiyet Bakımından Değerlendirilmesi

Sirkadiyen saat mekanizmasının pozitif düzenleyicileri BMAL1 ve CLOCK genin hasta ve kontrol grupları arasında cinsiyete bağlı olarak ekspresyon seviyeleri arasındaki farklılıklar değerlendirilerek p değerleri hesaplandı. Kadın ve erkeklerde BMAL1 ve CLOCK gen ekspresyon düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0.05$).



Şekil 4.2. Kontrol ve MM gruplarında cinsiyete bakımdan gen ekspresyon seviyeleri grafiği.

4.4. Vaka ve Kontrol Grubunda BMAL1 ve CLOCK Arasındaki Ekspresyon Seviyeleri Bakımından Değerlendirilmesi

Sirkadiyen düzenleyici genler olan BMAL1 ve CLOCK'ın gen ekspresyon seviyeleri arasındaki farklılıklar değerlendirilerek p değerleri hesaplandı. Vaka grubunda BMAL-1 ile CLOCK gen ekspresyon düzeyleri arasında pozitif yönlü, yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardır ($r=0,844$ $p<0.001$). Kontrol grubunda BMAL-1 ile CLOCK gen ekspresyon düzeyleri arasında pozitif yönlü, yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardır ($r=0,851$ $p<0.001$) (tablo 4:4).

Tablo 4.4. Vaka ve kontrol grubunda BMAL1 ve CLOCK arasındaki ekspresyon seviyeleri bakımından değerlendirilmesi.

			BMAL1	CLOCK
VAKA	BMAL1	r	1	0,844
		p	-	<0.001
	CLOCK	r	0,844	1
		p	<0.001	-
KONTROL	BMAL1	r	1	0,851
		p	-	<0.001
	CLOCK	r	0,851	1
		p	<0.001	-

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

MM, plazma hücrelerinin anormal farklılaşması sonucunda monoklonal protein salınımı ve son organ hasarı ile karakterizedir. Hastalık yüksek ölüm oranı ve yüksek ortanca yaşa sahiptir(72). Hastalığın sağkalım oranı ve patogenezi geniş bir heterojenite sunar. MM'nin sahip olduğu bu heterojenlik ya plazma hücrelerinin sahip olduğu genetik çeşitlilikten ya da malign hücrenin büyümesini kolaylaştıran bir kemik iliği mikro ortamı ile açıklanabilir(68). MM hastalığının tedavisinde geçtiğimiz on yılda immün düzenleyici proteazom inhibitörleri ve monoklonal antikolar gibi çeşitli hedefler geliştirilmiştir. MM hastalığının gelişen tedavi seçenekleri ile sağ kalım oranındaki iyileşmelere rağmen çoğu hasta tekrar nüks yaşar ve hastalık tedavi edilemez duruma gelir(73). Bu nedenle miyelomagenesi ve MM'yi oluşturan klonların biyolojisini daha detaylı inceleyerek semptomlar yerine hastalığın nedenlerini tedavi etmek bu konudaki önemli hedeflerden biridir.

Sirkadiyen saatler 24 saat süren aydınlık-karanlık döngüsünde ritmik olarak çalışırlar. Herhangi hücre veya dokuda eksprese edilen genlerin yaklaşık olarak %5-20 kadarının sirkadiyen olarak ritmik salınımlar gösterdiği bulunmuştur. Altında yatan temel mekanizma CLOCK-BMAL1'in kendi baskılayıcıları olan PER1, PER2, CRY1, CRY2 oluşumunu indüklemesi ile başlar. PER-CRY proteinleri ritmik olarak salınır ve hücrede yer alan çeşitli saat kontrollü genlerin (CCG's) transkripsiyonunu düzenler. Böylece hücreler senkronize edilerek aydınlık-karanlık döngülerine göre düzenlenmiş olurlar. Oluşan PER-CRY birlikteliği aynı zamanda CLOCK-BMAL1 inhibitörü olarak çalışarak transkripsiyonel bir geri besleme döngüsü oluşturulmuş olur. CLOCK-BMAL1 birlikteliği ayrıca kendisini baskılayan REV-ERB'in oluşumunu düzenler. Buda sirkadiyen saatin ikinci geri besleme döngüsünü oluşturur(74,75). Sirkadiyen saatler, hücre döngüsü ve gen ekspresyonu gibi hücre metabolik olayları düzenlediği gibi kan basıncı, vücut ısısı, uyku gibi fizyolojik süreçleri düzenleyen 24 saatlik salınımlardır. Endojen saatler tarafından üretilen bu içsel zamanlama sistemleri hücrelerin, organların ve hayvanların çevrelerindeki günlük değişikliklere karşı uyum kurmalarını sağlar. Daha genel bir ifade ile bir takım hücre içi saat proteinlerinin birleşerek oluşturduğu otopregülatuar döngülerin 24 saatlik ritimler halinde kendi kendine çalışmasıdır. Bu sayede canlıda bir iç zamanlama sistemi oluşturulur(76).

Sirkadiyen saatlerin birçok kanser biyogenezinde rol aldığı ortaya konulmuş olsa da bu konuda rolleri tam olarak aydınlatılmamıştır(77). Sirkadiyen saat ağının kanser gelişimindeki rolüne dair dört genel mekanizma vardır; birincisi, sirkadiyen saat bileşenleri, hücrelerde birçok genin ekspresyonunu doğrudan ya da dolaylı olarak düzenleyerek günlük ritimlere neden olur. Bu sayede besin metabolizması, otofaji, DNA hasar onarımı, protein katlanması, redoks

düzenlenmesi gibi hücrenel olaylar ile ilişki kurarlar. Sirkadiyen sistemin bozulması örnek verilen hücrenel süreçleri bozarak kanser gelişimine uygun bir hücrenel yapı oluşturulmasına katkı sağlar. İkinci olarak kanser gelişiminde rol alan proteinler ile sirkadiyen saat proteinin fiziksel olarak ilişki kurması, kanser gelişiminin ilerlemesine katkı sağlayabilir. Üçüncü olarak sirkadiyen saat proteinleri içinde bulunduğu ortamdan etkilenir. Örneğin redoks değişiklikleri ve onkojenik olayların oluşturduğu transkripsiyon sonrası düzenlenmeler saat proteilerinin stabilitesini ve işlevini değiştirebilir. Son olarak sitokinler, hormonlar, nörotransmitterler gibi bazı endokrin faktörler farklı dokulardaki saatleri senkronize etmek için sinyal iletebilir. Fakat bazı tümörler, bu tür saatle ilgili hormonları veya sitokinleri aşırı miktarda üreterek sirkadiyen saatin bozulmasına neden olur(50).

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar incelendiğinde sirkadiyen saat bozulması ve kanser ilişkisini gösteren birçok çalışma mevcuttur(78,79,80). Sirkadiyen saat hücre döngüsü, hücre ölümü, DNA onarımı ve hücre metabolizması gibi önemli hücrenel olaylarda görev almaktadır(78). Bu nedenle sirkadiyen saat bozulmasının kanser gelişimine katkı sağlayabileceği düşünülmüştür. Hücre döngüsünde yer alan kontrol noktalarının bozulması veya CDK inhibitörleri gibi tümör supresör genlerin mutasyona uğraması sonucunda hücreler malign gelişimine giderek hızlı proliferasyona uğrarlar. Hücre döngüsünde yer alan proteinlerin hedeflenmesi, kanser hücrelerinin elde ettiği bu büyüme avantajının engellenmesinde teröpatik hedeflerden biri olmuştur. Hücre döngüsü ve sirkadiyen saatin karşılıklı etkileşimi göz önüne alınarak bu iki osilatörün arasında etkileşimin bozulmasının karsinogenez gelişimine katkı sağlayabileceği düşünülmüştür. Ayrıca MYC'nin karsinogenezde sirkadiyen saati bozduğuna dair yapılan son bulgularda, sirkadiyen saat ile hücre döngüsü arasındaki etkilemin tek yönlü olmadığı gösterilmiştir(29). *Wee1*, *c-MYC*, *siklin D* ve *p21* gibi hücre döngüsü genleri BMAL1 ve CLOCK tarafından sirkadiyen düzenlenme altındadır(81). Yine hücre döngüsü kontrol noktasında görev alan p16 geninin, NONO ve PER birlikteliği ile sirkadiyen olarak düzenlendiği bildirilmiştir(82). BMAL1, doğrudan p53 geninin ekspresyonunu düzenleyerek apoptoz ve hücre döngüsünün durdurulmasını teşvik eden bir yolu transkripsiyonel olarak aktive edebilir(83). MM'de ise siklin D1, ATM ve p53 gibi hücre döngüsünde yer alan bazı genler ile RAS/MAPK yolundaki bazı onkogenlerin ve NF-KB yolunda görev alan *TRAF3* geninin mutasyona uğradığı bilinmektedir(84). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada bozulmuş sirkadiyen gen ağına sahip insan hepatosellüler karsinomunda (HCC), RAS/ERK ve NF-KB yolunun aşağı regülasyonu gözlenmiştir(85). Bu sonuçlar, MM gelişimindeki bazı genetik anomaliliklerin oluşumunda sirkadiyen saatin pozitif düzenleyicileri olan BMAL1 ve CLOCK'ın rol oynayabileceği fikrini düşündürmektedir.

Günümüzde sirkadiyen saat bozulmasının farklı doku tümörlerinde farklı sonuçlar vermesi bu konu üzerinde tartışılan nedenlerden biridir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada F-aktinin CLOCK ve BMAL1 tarafından düzenlendiğini ve RHOA ekspresyonunu yukarı doğru düzenleyerek RHOA'yı aktive edebildiklerini bildirmişlerdir. Bu sayede CLOCK ve BMAL1 kanser hücresi göçünü ve çoğalmasını destekleyen RHOA-ROCK-CFL yolundaki elemanlarının ifade edilmesini düzenledikleri bildirilmiştir(86). Bu durum bize sirkadiyen ritimin kanser gelişimindeki rolüne dair yeni bir bakış açısı kazandırmaktadır. Kanser hücrelerinde sirkadiyen saat genlerinin her zaman baskılanmadığı bazen kanser hücrelerinin bu mekanizmayı koruyarak büyüme avantajı elde etmeleri bazı çalışmalar ile düşünülmeye başlanmıştır. BMAL1'in düşük ekspresyonu sonucunda pankreas adenokarsinomu, meme kanseri ve melanom kanserlerinin oluşumu ile ilişki kurulmuştur. Bununla tutarlı olarak HCC, osteosarkom, yumurtalık ve hematolojik kanserlerde BMAL1'in aşırı ekspresyonu sonucunda tümör hücrelerinin büyümesini yavaşlattığı bildirilmiştir. Fakat yakın zamanda yapılan bir çalışmaya göre glioblastoma (GBM) gibi malign çeşitlerinde sirkadiyen saat mekanizmasının bozulmadığı aksine kanser hücresinin yaşaması için gerekli olduğunda bildirilmiştir(33). Bununla benzer olarak yapılan başka bir çalışmaya göre BMAL1 ve CLOCK'ın akut miyeloid lösemi hücrelerinde (AML) hücre proliferasyonu ve hücre dönüşümü ile ilerlemesini düzenleyerek AML hücrelerinin genel sağkalım için sirkadiyen saat mekanizmasına ihtiyaç duydukları bildirilmiştir(87). Bu çalışmalar farklı tümör dokularında saat genlerinin farklı özgüllükte ve işlevde çalışabileceğini göstermektedir. Yani sirkadiyen saat genlerinin bazen tümör baskılayıcı bazende onkogen gibi çalışması aslında bu genlerin dokulara özgü biçimde hareket edebilmesinin bir açıklamasıdır(33,88). Bunun nedenini sirkadiyen saat elemanlarının *Per-1,-2,-3*, *Cry-1,-2*, *Rev-erb- α , - β* , *Ror- α , - β , - γ* gibi çoklu homologlar olarak ifade edilmesi açıklayabilir. Bu nedenle saat bileşenlerinde meydana gelen mutasyonlar ve saat kontrollü genlerin (CCG's) farklı dokularda özelleşmesi doku tipine özgü tümör gelişiminde sirkadiyen saat rolünün farklılaşması fikrini destekleyebilir(50).

Sirkadiyen saat elemanlarının hücrede birçok önemli olaylardaki rolleri düşünüldüğünde, bu elemanları kanser türleri ile ilişkilendirilmiş olması olağan bir durumdur. PER, CRY ile sirkadiyen transkripsiyon ağının negatif düzenleyicileri olarak çalışırlar. Yapılan birçok çalışmada PER'in tümör baskılayıcı etkisi ortaya konulmuştur(89). PER2 geninin kaybının sonucunda genetiği değiştirilmiş farelerde lenfogeneze yatkınlık geliştiği bildirilmiştir(90). PER1'in glioma, mide, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK), meme ve prostat kanserlerinde miktarının azaldığı bildirilmiştir. PER2'nin aşağı regülasyonu sonucunda hücre döngüsü düzenleyicileri olan siklin D ve siklin E miktarı artarak invitro meme kanseri hücrelerinin büyümesini hızlandırır(91). Aynı şekilde son çalışmalar BMAL1'inde PER gibi bir tümör baskılayıcı olarak çalışabileceği gibi kanser gelişimini destekleyecek rolde sahip

olabileceğini göstermiştir. B hücreli lenfoma, kronik lenfosittik lösemi, akut miyeloid lösemi gibi hematolojik kanserlerde *BMAL1*'in aşağı regülasyonu gösterilmiştir(92-93). Yüksek *BMAL1* ekspresyonu, kolorektal kanser hücrelerinin büyümesini baskıladığı bildirilmiştir(94). *BMAL1* baskılanmasının murin kolon kanseri (C26) ve fibroblast hücrelerinde (L929) apoptozu azalttı. *BMAL1* kaybı sonucunda *PER1*, *PER2*, *PER3*, *Wee1*, *p53* ifadeleri azalırken *CDC2*, *siklin B1*, *siklin D1* ve *siklin E* ifadelerinin arttığı gösterilmiştir(95). Yumurtalık kanserinde *BMAL1*'in aşırı ekspresyonu kanser hücrelerinin büyümesini baskıladı ve c-MYC'nin ritmik ifadesini düzenlediği bildirilmiştir(96). Bu çalışmalar *BMAL1*'in baskılanmasının tümör süpresör rolüne örnek oluşturmaktadır. Fakat *BMAL1*'in bu rolünün karşıtını gösteren çalışmalar da yapılmıştır. Buna örnek olarak *BMAL1* geni nakvının MDA-MB-231 hücrelerinde invaziv kapasitelerini arttırırken, yine aynı hücrede apoptozu arttırdıkları gözlenmiştir. Fakat bu durum *CLOCK* geninde gözlenmeyip, *BMAL1*'in sirkadiyen saat görevinden bağımsız olarak hücrelerde zıt rollere sahip olabileceği fikrini düşündürmektedir. Ayrıca çalışmada PER ve CRY gibi saat elemanlarının silinmesinde iki genin hedeflenmesi gerekirken *BMAL1* için tek genin hedeflenmesi ile sirkadiyen ritimin bozulmasının sağlandığı belirtilmiştir (97). *BMAL1* geninin dokuya özgü olarak farklılaşmasının nedenleri, *BMAL1*'in sirkadiyen bağımlı ve bağımsız rollerinin aydınlatılması ile mümkün olacaktır.

Sirkadiyen saat mekanizmasının bozulması ile kanserogenez arasında ilişki olduğu yapılan çalışmalar ile kanıtlanmış olsada bunun altında yatan oluşumların birçoğu halen belirsizdir. Hücrelerde genomun önemli bir kısmının sirkadiyen olarak saat kontrollü genler tarafından düzenlenmesinin sonucunda hücre döngüsü, metabolizma, DNA hasarına yanıt gibi önemli hücresel olaylar ile yakın ilişkiye girilmesi, saat mekanizmasının hastalıklarla ilişkisini düşündürmüştür. Bu moleküler ilişkiler ağı belirsizliğini korusa da saat mekanizmasının bozulmasının kanser hücre oluşumunun bir nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu bu konuda alınması gereken önemli sorulardan biridir. Örneğin sirkadiyen saat mekanizması ile hücre döngüsü oldukça yakın ilişki içindedir. MYC'nin karsinogenezde sirkadiyen saati bozduğuna dair yapılan son bulgularda, sirkadiyen saat ile hücre döngüsü arasındaki etkilemin tek yönlü olmadığı gösterilmiştir. MYC, hücre döngüsünde rol olan transkripsiyon faktörüdür ve REV-ERB transkripsiyonunu indükleyerek bununla bağlantılı *BMAL1*'in baskılanmasını sağlar. Sonuç olarak saat kontrollü genlerin ifadesi bozulur. Yani bir taraftan sirkadiyen saat mekanizması MYC ifadesini düzenlerken diğer taraftan MYC'nin saat geni ifadesini etkileyebileceği gösterilmiştir(29). Bu durum sonucunda onkojenik olaylar sonrası hücre döngüsü bozulan kanser hücrelerinde sirkadiyen düzenlenmesinde bozulabileceği ve bununla ilişkili süreçlerin kanser gelişimine zincirleme şeklinde katkı sağlayabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Sirkadiyen saat transkripsiyon ağı içinde BMAL1 ve CLOCK proteinleri heterodimer yapıda birleşerek görev almaktadır(98). Yapılan bir çalışmada BMAL1-CLOCK'ın OLFML3 geninin ifadesini yukarı yönde düzenlediği ve bunun Glioblastoma (GBM) beyin kanserinde immün baskılayıcı mikroglia alımına yol açarak tümör bağışıklığın güçlenmesine neden olduğu ifade edilmiştir. CLOCK ve OLFML3 kaybının tümör içi mikroglia miktarının azalması sonucu genel sağkalımı arttırdığı açıklanmıştır(99). Yapılan çalışmalarda BMAL1 ve CLOCK'ın TERT transkripsiyonunu düzenleyerek telomerazın sirkadiyen kontrolüne katkı sağladığı bildirilmiştir. BMAL1 ve CLOCK tümörojenezde artan glikoliz metabolizmasına katkı sağlar. İnflamasyonda görev alan NF-kB yolunun düzenlenmesi BMAL1, CLOCK ve CRY'nin p53 alt birimini etkilemesi ile sağlanır. BMAL1 ve CLOCK'ın dimer olarak saat kontrollü genlerin (CCG's) ekspresyonunu düzelemeleri, onlara sirkadiyen saatin ilişkili olduğu hücresel olaylarda oldukça önemli görevler sunmaktadır. Hücre döngüsü elemanları olan siklinler, siklin inhibitörleri ve siklin bağımlı kinazlar (CDK) BMAL1-CLOCK tarafından sirkadiyen olarak düzenlenirler(33). Ayrıca BMAL1 ve CLOCK'ın hücrede glikoz homeostazında görev aldığı ve BMAL1 yokluğunda glukoneogenezin bozulduğu bildirilmiştir(100). Yaptığımız çalışmada BMAL1 ve CLOCK gen ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişkinin cinsiyete dayalı istatistiksel analizinde herhangi anlamlı fark bulunamamıştır. BMAL-1 ile CLOCK gen ekspresyon düzeyleri arasında pozitif yönlü, yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu bulunması BMAL1 ve CLOCK'ın dimerleşerek beraber çalıştıkları fikrini desteklemektedir.

Yaptığımız çalışmanın ana amacını, sirkadiyen düzenleyici genler olan BMAL1 ve CLOCK'ın MM patogeneziindeki rolünü aydınlatmak oluşturmaktadır. Günümüze kadar literatür çalışmalarını incelediğimizde MM ile sirkadiyen saat ilişkisini içeren çalışmalar oldukça azdır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmaya göre, BMAL1 ve CLOCK tarafından düzenlenen ve aynı zamanda sirkadiyen ağıngın antagonistik düzenleyicileri olan RORa ve Rev-ErbA'nın, kemik iliği mikro çevresinde rol alan TH₁₇ hücrelerinin gelişimi için oldukça önemli olduğu bildirilmiştir(101). Yapılan bir başka çalışmaya göre miyelom hastalarında serum eritroprotein seviyelerinde sirkadiyen ritimler gözlenmiştir(102). Ancak bu gelişmelere rağmen MM ile sirkadiyen saat ağıngın arasındaki ilişkinin ortaya çıkarılması yetersiz kalmaktadır. Diğer hematolojik kanserlerdeki çalışmalar incelendiğinde Kronik Miyeloid Lösemi (KML) hastalarında PER1, PER2, PER3, CRY1, CRY2 ve BMAL1 ekspresyon düzeylerinin normal bireylere göre oldukça bozulduğu gösterilmiştir(103). Sirkadiyen saatin önemli elemanı olan BMAL1'in, Yaygın Büyük B Hücreli Lenfoma, Akut Lenfositik ve Miyeloid Lösemiler gibi hematolojik malignitelere hipermetilasyona uğradığı bildirilmiştir(92,104). Bu bilgilerin karşıtı olarak yapılan bir çalışmada malign plevral mezotelyoma (MPM) hücrelerinde BMAL1 yıkımının MPM hücrelerinde klonal büyümeyi bastırıldığı gözlenmiştir. Aynı çalışmada BMAL1 yokluğunda, Wee1, siklin B ve

p21'in (WAF1/CIP1) aşağı regülasyonu ve siklin E'nin ekspresyonunun yukarı regülasyonu sonucunda hücre döngüsünün bozulduğu bildirilmiştir (105). Bu durum, kanser gelişiminde BMAL1'in dokuya özgü davrandığı ve her kanser türünde düşük ekspresyon göstermeme fikrini desteklemektedir. Çalışma sonucunda elde ettiğimiz *BMAL1* gen ekspresyon artışının malign plazma hücrelerinde bir büyüme avantajı olarak kullanılması yoluyla MM etiyojisinde yer alabileceğini düşünmekteyiz. *CLOCK* için ise hasta ve kontrol grupları arasında ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Sonuç olarak sirkadiyen saat metabolizmasının kanser hücrelerinde her zaman bozulmayacağı fikrine yaklaştırabiliriz. Bu durumun nedeni arasında sirkadiyen saat elemanlarının hücrelerde farklı saat kontrollü genlerin ifadesini düzenleyerek farklı biyolojik olaylarda görev alması olabilir. Ayrıca *CLOCK* için ekspresyon seviyeleri bakımından anlamlı bir fark bulunamamış olması bize net bir sonuç kazandırmamakla birlikte daha fazla örneklem sayısında deneyin tekrarlanması ile *CLOCK* hakkındaki görüşleri değiştirebilir. Günümüze kadar yapılan çalışmaların ışığında bozulan sirkadiyen mekanizma kanser ile ilişkilendirilmiş olsada saat genlerinin farklı tümörlerde farklı davranmaları tartışmaya açık alan bırakılmaktadır. Bu nedenle sirkadiyen saat mekanizmasının ve ayrıca tedavisi olmayan MM'nin altında yatan olayların ileride yapılacak çalışmalar ile aydınlatılması, *BMAL1* ve *CLOCK* gibi sirkadiyen düzenleyicileri yeni kanser hedefleri haline getirebilir.

KAYNAKLAR

- [1]. Lamia, K. A. (2017). Ticking time bombs: connections between circadian clocks and cancer. *F1000Research*, 6.
- [2]. Verlande, A., & Masri, S. (2019). Circadian clocks and cancer: timekeeping governs cellular metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 30(7), 445-458.
- [3]. Masri, S., & Sassone-Corsi, P. (2018). The emerging link between cancer, metabolism, and circadian rhythms. *Nature medicine*, 24(12), 1795-1803.
- [4]. Davis, K., Roden, L. C., Leaner, V. D., & van der Watt, P. J. (2019). The tumour suppressing role of the circadian clock. *IUBMB life*, 71(7), 771-780.
- [5]. Soták, M., Sumová, A., & Pácha, J. (2014). Cross-talk between the circadian clock and the cell cycle in cancer. *Annals of medicine*, 46(4), 221-232.
- [6]. Kinouchi, K., & Sassone-Corsi, P. (2020). Metabolic rivalry: circadian homeostasis and tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*, 20(11), 645-661.
- [7]. Xie, Y., Tang, Q., Chen, G., Xie, M., Yu, S., Zhao, J., & Chen, L. (2019). New insights into the circadian rhythm and its related diseases. *Frontiers in physiology*, 10, 682.
- [8]. Heyde, I., & Oster, H. (2019). Differentiating external zeitgeber impact on peripheral circadian clock resetting. *Scientific reports*, 9(1), 1-13.
- [9]. Sancar, A., & Van Gelder, R. N. (2021). Clocks, cancer, and chronochemotherapy. *Science*, 371(6524).
- [10]. Patke, A., Young, M. W., & Axelrod, S. (2020). Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms. *Nature reviews Molecular cell biology*, 21(2), 67-84.
- [11]. De Assis, L. V. M., Moraes, M. N., Magalhães-Marques, K. K., Kinker, G. S., da Silveira Cruz-Machado, S., & de Lauro Castrucci, A. M. (2018). Non-metastatic cutaneous melanoma induces chronodisruption in central and peripheral circadian clocks. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 1065.
- [12]. de Assis, L. V. M., Kinker, G. S., Moraes, M. N., Markus, R. P., Fernandes, P. A., & Castrucci, A. M. D. L. (2018). Expression of the circadian clock gene BMAL1 positively correlates with antitumor immunity and patient survival in metastatic melanoma. *Frontiers in oncology*, 8, 185.
- [13]. Li, W., Liu, L., Liu, D., Jin, S., Yang, Y., Tang, W., & Gong, L. (2016). Decreased circadian component Bmal1 predicts tumor progression and poor prognosis in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Biochemical and biophysical research communications*, 472(1), 156-162.

- [14]. Mazzocchi, G., Panza, A., Valvano, M. R., Palumbo, O., Carella, M., Paziienza, V., ... & Piepoli, A. (2011). Clock gene expression levels and relationship with clinical and pathological features in colorectal cancer patients. *Chronobiology international*, 28(10), 841-851.
- [15]. Fekry, B., Ribas-Latre, A., Baumgartner, C., Deans, J. R., Kwok, C., Patel, P., ... & Eckel-Mahan, K. (2018). Incompatibility of the circadian protein BMAL1 and HNF4 α in hepatocellular carcinoma. *Nature communications*, 9(1), 1-17.
- [16]. Zhu, J., Zhou, Q., Pan, M., & Zhou, C. (2021). Multi-omics analysis of the prognosis and therapeutic significance of circadian clock in ovarian cancer. *Gene*, 788, 145644.
- [17]. Zhang, S., Zhang, J., Deng, Z., Liu, H., Mao, W., Jiang, F., ... & Li, J. D. (2016). Circadian clock components ROR α and Bmal1 mediate the anti-proliferative effect of MLN4924 in osteosarcoma cells. *Oncotarget*, 7(40), 66087.
- [18]. Dong, P., Wang, Y., Liu, Y., Zhu, C., Lin, J., Qian, R., Hua, L., & Lu, C. (2021). BMAL1 induces colorectal cancer metastasis by stimulating exosome secretion. *Molecular biology reports*, 10.1007/s11033-021-06883-z. Advance online publication.
- [19]. Dai, H., Zhang, L., Cao, M., Song, F., Zheng, H., Zhu, X., ... & Chen, K. (2011). The role of polymorphisms in circadian pathway genes in breast tumorigenesis. *Breast cancer research and treatment*, 127(2), 531-540.
- [20]. Barwick, B. G., Gupta, V. A., Vertino, P. M., & Boise, L. H. (2019). Cell of origin and genetic alterations in the pathogenesis of multiple myeloma. *Frontiers in immunology*, 10, 1121.
- [21]. Rajkumar, S. V., & Kumar, S. (2016, January). Multiple myeloma: diagnosis and treatment. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 91, No. 1, pp. 101-119). Elsevier.
- [22]. Hiasa, M., Harada, T., Tanaka, E., & Abe, M. (2021). Pathogenesis and treatment of multiple myeloma bone disease. *Japanese Dental Science Review*, 57, 164-173.
- [23]. Lopes, R., Caetano, J., Ferreira, B., Barahona, F., Carneiro, E. A., & João, C. (2021). The Immune Microenvironment in Multiple Myeloma: Friend or Foe?. *Cancers*, 13(4), 625.
- [24]. Maura, F., Rustad, E. H., Boyle, E. M., & Morgan, G. J. (2020). Reconstructing the evolutionary history of multiple myeloma. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 33(1), 101145.
- [25]. Chen, T., Moscvin, M., & Bianchi, G. (2020). Exosomes in the pathogenesis and treatment of multiple myeloma in the context of the bone marrow microenvironment. *Frontiers in Oncology*, 10.
- [26]. Heider, M., Nickel, K., Högner, M., & Bassermann, F. (2021). Multiple myeloma: molecular pathogenesis and disease evolution. *Oncology Research and Treatment*, 44(12), 672-681.

- [27]. Fu, L., & Lee, C. C. (2003). The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 350-361.
- [28]. Rana, S., & Mahmood, S. (2010). Circadian rhythm and its role in malignancy. *Journal of circadian rhythms*, 8(1), 1-13.
- [29]. Gaucher, J., Montellier, E., & Sassone-Corsi, P. (2018). Molecular cogs: interplay between circadian clock and cell cycle. *Trends in Cell Biology*, 28(5), 368-379.
- [30]. Vitaterna, M. H., Takahashi, J. S., & Turek, F. W. (2001). Overview of circadian rhythms. *Alcohol Research & Health*, 25(2), 85.
- [31]. Froy, O. (2007). The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals. *Frontiers in neuroendocrinology*, 28(2-3), 61-71.
- [32]. Yang, Y., Lindsey-Boltz, L. A., Vaughn, C. M., Selby, C. P., Cao, X., Liu, Z., ... & Sancar, A. (2021). Circadian clock, carcinogenesis, chronochemotherapy connections. *Journal of Biological Chemistry*, 297(3).
- [33]. Battaglin, F., Chan, P., Pan, Y., Soni, S., Qu, M., Spiller, E. R., ... & Lenz, H. J. (2021). Clocking cancer: the circadian clock as a target in cancer therapy. *Oncogene*, 40(18), 3187-3200.
- [34]. Hower, I. M., Harper, S. A., & Buford, T. W. (2018). Circadian rhythms, exercise, and cardiovascular health. *Journal of circadian rhythms*, 16.
- [35]. Schmal, C., Herzog, H., & Myung, J. (2020). Clocks in the wild: entrainment to natural light. *Frontiers in physiology*, 11, 272.
- [36]. Hsu, C. N., & Tain, Y. L. (2020). Light and circadian signaling pathway in pregnancy: Programming of adult health and disease. *International journal of molecular sciences*, 21(6), 2232.
- [37]. Hankins, M. W., Peirson, S. N., & Foster, R. G. (2008). Melanopsin: an exciting photopigment. *Trends in neurosciences*, 31(1), 27-36.
- [38]. Downton, P., Early, J. O., & Gibbs, J. E. (2020). Circadian rhythms in adaptive immunity. *Immunology*, 161(4), 268-277.
- [39]. Takahashi, J. S. (2017). Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nature Reviews Genetics*, 18(3), 164-179.
- [40]. Dang, F., Nie, L., & Wei, W. (2021). Ubiquitin signaling in cell cycle control and tumorigenesis. *Cell Death & Differentiation*, 28(2), 427-438.
- [41]. Matthews, H. K., Bertoli, C., & de Bruin, R. A. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(1), 74-88.

- [42]. Yan, J., & Goldbeter, A. (2019). Robust synchronization of the cell cycle and the circadian clock through bidirectional coupling. *Journal of the Royal Society Interface*, 16(158), 20190376.
- [43]. Chakrabarti, S., & Michor, F. (2020). Circadian clock effects on cellular proliferation: insights from theory and experiments. *Current opinion in cell biology*, 67, 17-26.
- [44]. Sahar, S., & Sassone-Corsi, P. (2009). Metabolism and cancer: the circadian clock connection. *Nature Reviews Cancer*, 9(12), 886-896.
- [45]. Lee, E., & Kim, M. (2019). Light and life at night as circadian rhythm disruptors. *Chronobiology in Medicine*, 1(3), 95-102.
- [46]. Walker, W. H., Walton, J. C., DeVries, A. C., & Nelson, R. J. (2020). Circadian rhythm disruption and mental health. *Translational Psychiatry*, 10(1), 1-13.
- [47]. Khan, S., Duan, P., Yao, L., & Hou, H. (2018). Shiftwork-mediated disruptions of circadian rhythms and sleep homeostasis cause serious health problems. *International journal of genomics*, 2018.
- [48]. Hou, Y., Liu, L., Chen, X., Li, Q., & Li, J. (2020). Association between circadian disruption and diseases: A narrative review. *Life Sciences*, 118512.
- [49]. Kervezee, L., Kosmadopoulos, A., & Boivin, D. B. (2020). Metabolic and cardiovascular consequences of shift work: The role of circadian disruption and sleep disturbances. *European Journal of Neuroscience*, 51(1), 396-412.
- [50]. Sulli, G., Lam, M. T. Y., & Panda, S. (2019). Interplay between circadian clock and cancer: new frontiers for cancer treatment. *Trends in cancer*, 5(8), 475-494.
- [51]. Salamanca-Fernández, E., Rodríguez-Barranco, M., Guevara, M., Ardanaz, E., & Sánchez, M. J. (2018, August). Night-shift work and breast and prostate cancer risk: updating the evidence from epidemiological studies. In *Anales del sistema sanitario de Navarra* (Vol. 41, No. 2, pp. 211-226).
- [52]. Straif, K., Baan, R., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., ... & WHO International Agency For Research on Cancer Monograph Working Group. (2007). Carcinogenicity of shift-work, painting, and fire-fighting.
- [53]. Güler, C., & Peynircioğlu, B. B. (2016). DNA metilasyonu ve hastalıklarla ilişkisi. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, (2), 61-68.
- [54]. Gürel, Ç., Nursal, A. F., & Yiğit, S. (2016). Epigenetik ve kanser. *Türkiye Klinikleri J Radiat Oncol-Special Topics*, 2(1), 45-51.

- [55]. Reszka, E., & Zienolddiny, S. (2018). Epigenetic basis of circadian rhythm disruption in cancer. *Cancer Epigenetics for Precision Medicine*, 173-201.
- [56]. Giannakoulas, N., Ntanasis-Stathopoulos, I., & Terpos, E. (2021). The Role of Marrow Microenvironment in the Growth and Development of Malignant Plasma Cells in Multiple Myeloma. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4462.
- [57]. van de Donk, N., Pawlyn, C., & Yong, K. L. (2021). Multiple myeloma. *Lancet (London, England)*, 397(10272), 410-427.
- [58]. Xu, T., Yang, W., Chen, L. ve Gao, G. (2019). Miyelom tedavisi için maliyetin etkileri nelerdir? *Hematolojinin uzman incelemesi* , 12 (12), 1005-1009.
- [59]. Furukawa, Y., & Kikuchi, J. (2015). Molecular pathogenesis of multiple myeloma. *International journal of clinical oncology*, 20(3), 413-422.
- [60]. Kumar, S. K., Rajkumar, V., Kyle, R. A., van Duin, M., Sonneveld, P., Mateos, M. V., Gay, F., & Anderson, K. C. (2017). Multiple myeloma.
- [61]. Pawlyn, C., & Morgan, G. J. (2017). Evolutionary biology of high-risk multiple myeloma. *Nature Reviews Cancer*, 17(9), 543-556.
- [62]. Pinto, V., Bergantim, R., Caires, H. R., Seca, H., Guimarães, J. E., & Vasconcelos, M. H. (2020). Multiple myeloma: Available therapies and causes of drug resistance. *Cancers*, 12(2), 407.
- [63]. Padala, S. A., Barsouk, A., Barsouk, A., Rawla, P., Vakiti, A., Kolhe, R., ... & Ajebo, G. H. (2021). Epidemiology, Staging, and Management of Multiple Myeloma. *Medical Sciences*, 9(1), 3.
- [64]. Kumar, S. K., & Rajkumar, S. V. (2018). The multiple myelomas—current concepts in cytogenetic classification and therapy. *Nature reviews Clinical oncology*, 15(7), 409-421.
- [65]. Cardona-Benavides, I. J., de Ramón, C., & Gutiérrez, N. C. (2021). Genetic Abnormalities in Multiple Myeloma: Prognostic and Therapeutic Implications. *Cells*, 10(2), 336.
- [66]. Ho, M., Patel, A., Goh, C. Y., Moscvin, M., Zhang, L., & Bianchi, G. (2020). Changing paradigms in diagnosis and treatment of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM). *Leukemia*, 34(12), 3111-3125.
- [67]. Saxe, D., Seo, E. J., Beaulieu Bergeron, M., & Han, J. Y. (2019). Recent advances in cytogenetic characterization of multiple myeloma. *International journal of laboratory hematology*, 41(1), 5-14.
- [68]. Burroughs García, J., Eufemiese, R. A., Storti, P., Sammarelli, G., Craviotto, L., Todaro, G., ... & Giuliani, N. (2021). Role of 1q21 in Multiple Myeloma: From Pathogenesis to Possible Therapeutic Targets. *Cells*, 10(6), 1360.

- [69]. Lomas, O. C., Tahri, S., & Ghobrial, I. M. (2020). The microenvironment in myeloma. *Current opinion in oncology*, 32(2), 170-175.
- [70]. Hou, J., Wei, R., Qian, J., Wang, R., Fan, Z., Gu, C., & Yang, Y. (2019). The impact of the bone marrow microenvironment on multiple myeloma. *Oncology reports*, 42(4), 1272-1282.
- [71]. Di Marzo, L., Desantis, V., Solimando, A. G., Ruggieri, S., Annese, T., Nico, B., ... & Frassanito, M. A. (2016). Microenvironment drug resistance in multiple myeloma: emerging new players. *Oncotarget*, 7(37), 60698.
- [72]. Karam, D., & Kumar, S. (2021). Post-Transplant Maintenance Treatment Options in Multiple Myeloma. *Oncology and Therapy*, 1-20.
- [73]. Willenbacher, W., Seeber, A., Steiner, N., Willenbacher, E., Gatalica, Z., Swensen, J., ... & Vranic, S. (2018). Towards molecular profiling in multiple myeloma: a literature review and early indications of its efficacy for informing treatment strategies. *International journal of molecular sciences*, 19(7), 2087.
- [74]. Mukherji, A., Bailey, S. M., Staels, B., & Baumert, T. F. (2019). The circadian clock and liver function in health and disease. *Journal of hepatology*, 71(1), 200-211.
- [75]. Cox, K. H., & Takahashi, J. S. (2019). Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the clock mechanism. *Journal of molecular endocrinology*, 63(4), R93-R102.
- [76]. Challet, E. (2019). The circadian regulation of food intake. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(7), 393-405.
- [77]. Altman, B. J., Hsieh, A. L., Sengupta, A., Krishnanaiah, S. Y., Stine, Z. E., Walton, Z. E., ... & Dang, C. V. (2015). MYC disrupts the circadian clock and metabolism in cancer cells. *Cell metabolism*, 22(6), 1009-1019.
- [78]. Shafi, A. A., & Knudsen, K. E. (2019). Cancer and the circadian clock. *Cancer research*, 79(15), 3806-3814.
- [79]. Blakeman, V., Williams, J. L., Meng, Q. J., & Streuli, C. H. (2016). Circadian clocks and breast cancer. *Breast Cancer Research*, 18(1), 1-9.
- [80]. Morgan, M. N., Dvuchbabny, S., Martinez, C. A., Kerr, B., Cistulli, P. A., & Cook, K. M. (2019). The cancer clock is (not) ticking: links between circadian rhythms and cancer. *Clocks & sleep*, 1(4), 435-458.
- [81]. Kelleher, F. C., Rao, A., & Maguire, A. (2014). Circadian molecular clocks and cancer. *Cancer letters*, 342(1), 9-18.

- [82]. Kowalska, E., Ripperger, J. A., Hoegger, D. C., Bruegger, P., Buch, T., Birchler, T., ... & Brown, S. A. (2013). NONO couples the circadian clock to the cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(5), 1592-1599.
- [83]. Jiang, W., Zhao, S., Jiang, X., Zhang, E., Hu, G., Hu, B., ... & Wan, R. (2016). The circadian clock gene *Bmal1* acts as a potential anti-oncogene in pancreatic cancer by activating the p53 tumor suppressor pathway. *Cancer letters*, 371(2), 314-325.
- [84]. Hassan, H., & Szalat, R. (2021). Genetic Predictors of Mortality in Patients with Multiple Myeloma. *The Application of Clinical Genetics*, 14, 241.
- [85]. Hanley, K. L., Liang, Y., Wang, G., Lin, X., Yang, M., Karin, M., ... & Feng, G. S. (2021). Concurrent Disruption of the Ras/MAPK and NF- κ B Pathways Induces Circadian Deregulation and Hepatocarcinogenesis. *Molecular Cancer Research*.
- [86]. Ma, T. J., Zhang, Z. W., Lu, Y. L., Zhang, Y. Y., Tao, D. C., Liu, Y. Q., & Ma, Y. X. (2018). CLOCK and BMAL1 stabilize and activate RHOA to promote F-actin formation in cancer cells. *Experimental & molecular medicine*, 50(10), 1-15.
- [87]. Puram, R. V., Kowalczyk, M. S., de Boer, C. G., Schneider, R. K., Miller, P. G., McConkey, M., ... & Ebert, B. L. (2016). Core circadian clock genes regulate leukemia stem cells in AML. *Cell*, 165(2), 303-316.
- [88]. García-Costela, M., Escudero-Feliú, J., Puentes-Pardo, J. D., San Juan, S. M., Morales-Santana, S., Ríos-Arrabal, S., ... & León, J. (2020). Circadian Genes as Therapeutic Targets in Pancreatic Cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 11.
- [89]. Son, B., Do, H., Kim, E., Youn, B., & Kim, W. (2017). Circadian clock genes, PER1 and PER2, as tumor suppressors. *Journal of Life Science*, 27(10), 1225-1231.
- [90]. Fu, L., Pelicano, H., Liu, J., Huang, P., & Lee, C. C. (2002). The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *cell*, 111(1), 41-50.
- [91]. Yang, X., Wood, P. A., Oh, E. Y., Du-Quiton, J., Ansell, C. M., & Hrushesky, W. J. (2009). Down regulation of circadian clock gene *Period 2* accelerates breast cancer growth by altering its daily growth rhythm. *Breast cancer research and treatment*, 117(2), 423-431.
- [92]. Taniguchi, H., Fernández, A. F., Setién, F., Ropero, S., Ballestar, E., Villanueva, A., ... & Esteller, M. (2009). Epigenetic inactivation of the circadian clock gene *BMAL1* in hematologic malignancies. *Cancer research*, 69(21), 8447-8454.
- [93]. Savvidis, C., & Koutsilieris, M. (2012). Circadian rhythm disruption in cancer biology. *Molecular medicine*, 18(9), 1249-1260.

- [94]. Zeng, Z. L., Luo, H. Y., Yang, J., Wu, W. J., Chen, D. L., Huang, P., & Xu, R. H. (2014). Overexpression of the circadian clock gene *Bmal1* increases sensitivity to oxaliplatin in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 20(4), 1042-1052.
- [95]. Zeng, Z. L., Wu, M. W., Sun, J., Sun, Y. L., Cai, Y. C., Huang, Y. J., & Xian, L. J. (2010). Effects of the biological clock gene *Bmal1* on tumour growth and anti-cancer drug activity. *The journal of biochemistry*, 148(3), 319-326.
- [96]. Yeh, C. M., Shay, J., Zeng, T. C., Chou, J. L., Huang, T. H. M., Lai, H. C., & Chan, M. W. (2014). Epigenetic silencing of *ARNTL*, a circadian gene and potential tumor suppressor in ovarian cancer. *International journal of oncology*, 45(5), 2101-2107
- [97]. Korkmaz, T., Aygenli, F., Emisoglu, H., Ozcelik, G., Canturk, A., Yilmaz, S., & Ozturk, N. (2018). Opposite carcinogenic effects of circadian clock gene *BMAL1*. *Scientific reports*, 8(1), 1-11.
- [98]. Cha, H. K., Chung, S., Lim, H. Y., Jung, J. W., & Son, G. H. (2019). Small molecule modulators of the circadian molecular clock with implications for neuropsychiatric diseases. *Frontiers in molecular neuroscience*, 11, 496.
- [99]. Chen, P., Hsu, W. H., Chang, A., Tan, Z., Lan, Z., Zhou, A., Spring, D. J., Lang, F. F., Wang, Y. A., & DePinho, R. A. (2020). Circadian Regulator *CLOCK* Recruits Immune-Suppressive Microglia into the GBM Tumor Microenvironment. *Cancer discovery*, 10(3), 371-381.
- [100]. Rudic, R. D., McNamara, P., Curtis, A. M., Boston, R. C., Panda, S., Hogenesch, J. B., ... & O'Rahilly, S. (2004). *BMAL1* and *CLOCK*, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS biology*, 2(11), e377.
- [101]. Chattopadhyay, S., Thomsen, H., Yadav, P., da Silva Filho, M. I., Weinhold, N., Nöthen, M. M., ... & Försti, A. (2019). Genome-wide interaction and pathway-based identification of key regulators in multiple myeloma. *Communications biology*, 2(1), 1-10.
- [102]. Pasqualetti, P., Collacciani, A., & Casale, R. (1996). Circadian rhythm of serum erythropoietin in multiple myeloma. *American journal of hematology*, 53(1), 40-42.
- [103]. Yang, M. Y., Chang, J. G., Lin, P. M., Tang, K. P., Chen, Y. H., Lin, H. Y. H., ... & Lin, S. F. (2006). Downregulation of circadian clock genes in chronic myeloid leukemia: alternative methylation pattern of *hPER3*. *Cancer science*, 97(12), 1298-1307.
- [104]. Satou, R., Sugihara, N., Ishizuka, Y., Matsukubo, T., & Onishi, Y. (2013). DNA methylation of the *BMAL1* promoter. *Biochemical and biophysical research communications*, 440(3), 449-453.

- [105]**. Elshazley, M., Sato, M., Hase, T., Yamashita, R., Yoshida, K., Toyokuni, S., ... & Hasegawa, Y. **(2012)**. The circadian clock gene BMAL1 is a novel therapeutic target for malignant pleural mesothelioma. *International journal of cancer*, 131(12), 2820-2831.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı :

Doğum Tarihi :

E-mail :

Öğrenim Durumu

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans			
Yüksek Lisans			
Doktora			

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayınız)

Görevi	Kurum	Yıl

YAYINLAR (Makaleler/Bildiriler/Ödüller)

- 1.
- 2.
- 3.