

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

**DİSÜLFİRAM İLE MUAMELE EDİLEN MULTİPL  
MİYELOM HÜCRELERİNDE FERROPTOZİS  
HÜCRE ÖLÜM YOLAĞININ ARAŞTIRILMASI**

**ÇAĞLAR ARKAN**

**Danışman: Dr. Öğr. Üyesi DİLARA AKÇORA YILDIZ**

**BURDUR, 2023**

## ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Disülfiram ile Muamele Edilen Multipl Miyelom Hücrelerinde Ferroptosis Hücre Ölüm Yolağının Araştırılması**” başlıklı bu tezin;

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

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

08/02/2023

Çağlar ARKAN

## **ÖNSÖZ ve/veya TEŞEKKÜR**

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

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

Araştırmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm laboratuvar arkadaşlarım Gamze BOZKAYA ve Yakuphan BAYKAN'a

Biyokimyasal analizler sırasında yardımlarını gördüğüm Doç. Dr. Burcu Menekşe BALKAN'a

Akış sitometrisi analizlerinin yapılmasında katkılarından dolayı Veteriner Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'na

Çalışmalarım sırasında beni her anlamda destekleyen Doç. Dr. Ramazan YILDIZ'a teşekkür ederim.

0684-YL-20 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim. Eğitim hayatımın her aşamasında beni her anlamda destekleyen aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

**Şubat, 2023**

**Çağlar ARKAN**

# İÇİNDEKİLER

|                                                                                                          | Sayfa |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| ÖNSÖZ ve/veya TEŞEKKÜR.....                                                                              | i     |
| İÇİNDEKİLER.....                                                                                         | ii    |
| ŞEKİL DİZİNİ.....                                                                                        | iv    |
| TABLO DİZİNİ.....                                                                                        | vi    |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....                                                                      | vii   |
| ÖZET.....                                                                                                | ix    |
| SUMMARY .....                                                                                            | x     |
| 1. GİRİŞ.....                                                                                            | 1     |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                                                                   | 4     |
| 2.1. Multipl Miyelom.....                                                                                | 4     |
| 2.2. Multipl Miyelomda Tedavi Yöntemleri.....                                                            | 5     |
| 2.3. MM’da İlaç Direnci Mekanizmaları .....                                                              | 6     |
| 2.3.1 Glukokortikoidlere Karşı Gelişen Direnç .....                                                      | 7     |
| 2.3.2. Kemoterapötik Ajanlara Karşı Gelişen Direnç .....                                                 | 7     |
| 2.3.3. Proteazom İnhibitörlerine Karşı Gelişen Direnç.....                                               | 8     |
| 2.4. Programlanmış Hücre Ölüm Tipleri .....                                                              | 10    |
| 2.5. Ferroptozis Oluşumu.....                                                                            | 11    |
| 2.5.1. Ferroptozis Metabolik Yolu .....                                                                  | 12    |
| 2.5.2. Antioksidan Metabolizması .....                                                                   | 12    |
| 2.5.3. Demir Metabolizması.....                                                                          | 13    |
| 2.5.4. Lipid Metabolizması .....                                                                         | 13    |
| 2.6. TP53’ün Ferroptozisdeki Rolü.....                                                                   | 14    |
| 2.7. Ferroptoziste ptgs2’nin Rolü .....                                                                  | 14    |
| 2.8. Disülfiram (DSF) .....                                                                              | 14    |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM.....                                                                               | 17    |
| 3.1. GEREÇ .....                                                                                         | 17    |
| 3.1.1. Multiple Miyelom (MM) Hücre Hatları .....                                                         | 17    |
| 3.1.2. Kimyasallar ve Kitler.....                                                                        | 17    |
| 3.1.3. Cihazlar.....                                                                                     | 17    |
| 3.2. YÖNTEM .....                                                                                        | 19    |
| 3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları.....                                                                    | 19    |
| 3.2.2. Disülfiram Stok ve Uygulama Solüsyonlarının Hazırlanması.....                                     | 19    |
| 3.2.3. MTT Yöntemi ile Canlılık Tayini.....                                                              | 19    |
| 3.2.4. MDA Analizi .....                                                                                 | 20    |
| 3.2.5. Akış Sitometri ile Mitokondriyal Membran Potansiyeli ve Stoplazmik ROS<br>Miktarının Tayini ..... | 21    |
| 3.2.6. Total RNA İzolasyonu .....                                                                        | 21    |
| 3.2.7. DNaz Muamelesi ve cDNA Sentezi .....                                                              | 22    |
| 3.2.7.1. DNaz Muamelesi.....                                                                             | 22    |

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.7.2. cDNA Sentezi.....                                                                            | 22 |
| 3.2.8. Eş-Zamanlı Kantitatif PCR (qPCR).....                                                          | 23 |
| 3.2.9. İstatistiksel Analiz.....                                                                      | 24 |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA .....                                                              | 25 |
| 4.1. DSF’ın MM Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....                                                    | 25 |
| 4.2. MM Hücrelerinde DSF Muamelesinin Ferroptosis Üzerine Etkisi .....                                | 26 |
| 4.2.1. MM Hücrelerinde DSF’ın Ferroptosis Belirteci Olan Lipit Peroksidasyonu<br>Üzerine Etkisi ..... | 26 |
| 4.2.2. MM Hücrelerinde DSF’ın Ferroptosisin Oluşmasında Rol Oynayan ROS Üzerine<br>Etkisi.....        | 29 |
| 4.2.3. MM Hücrelerinde DSF’ın Mitokondriyal Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi .                      | 31 |
| 4.2.4. MM Hücrelerinde DSF’ın Ferroptotik Genlerin mRNA Ekspresyonları Üzerine<br>Etkisi.....         | 33 |
| 4.2.4.1. GPX4 mRNA ekspresyon değişimi .....                                                          | 33 |
| 4.2.4.2. TF mRNA ekspresyon değişimi.....                                                             | 34 |
| 4.2.4.3. ALOX15 mRNA Ekspresyon Değişimi.....                                                         | 35 |
| 4.2.4.4. TP53 mRNA Ekspresyon Değişimi .....                                                          | 36 |
| 4.2.4.5. SLC7A11 mRNA Ekspresyon Değişimi.....                                                        | 37 |
| 4.2.4.6. SAT1 mRNA Ekspresyon Değişimi .....                                                          | 38 |
| 4.2.4.7. ptgs2 mRNA Ekspresyon Değişimi .....                                                         | 39 |
| 4.2. TARTIŞMA .....                                                                                   | 40 |
| 5. SONUÇ .....                                                                                        | 45 |
| KAYNAKLAR.....                                                                                        | 47 |

## ŞEKİL DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                    | Sayfa |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 2.1. MM gelişimi.....                                                                                                                                                                                                                                        | 4     |
| Şekil 2.2. CuET eyleminin basitleştirilmiş şeması.....                                                                                                                                                                                                             | 15    |
| Şekil 4.1. DSF ile 48 saat muamele edilen NCI H929 hücrelerinde hücre canlılığı grafiği .....                                                                                                                                                                      | 25    |
| Şekil 4.2. DSF ile 48 saat muamele edilen U266 hücrelerinde hücre canlılığı grafiği .....                                                                                                                                                                          | 26    |
| Şekil 4.3. DSF ile 48 saat muamele edilen RPMI 8226 hücrelerinde hücre canlılığı grafiği .....                                                                                                                                                                     | 26    |
| Şekil 4.4. NCI H929 hücrelerinde 48 saatlik DSF muamelesinin ardından MDA miktarındaki değişim .....                                                                                                                                                               | 27    |
| Şekil 4.5. U266 hücrelerinde 48 saatlik DSF muamelesinin ardından MDA miktarındaki değişim.....                                                                                                                                                                    | 28    |
| Şekil 4.6. RPMI 8226 hücrelerinde 48 saatlik DSF muamelesinin ardından MDA miktarındaki değişim .....                                                                                                                                                              | 28    |
| Şekil 4.7. Kontrol (DMSO), DSF ve pozitif kontrol olarak H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%3) ile 48 saat muamele edilen NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücrelerinin hücre içi ROS miktarını gösteren H2DFCDA floresan boyamasının temsili akış sitometri görüntüleri.. | 30    |
| Şekil 4.8. Kontrol (DMSO), DSF ve pozitif kontrol olarak H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%3) ile 48 saat muamele edilen NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde H2DFCDA floresan boyamasının kantitasyonunu gösteren grafikler .....                               | 31    |
| Şekil 4.9. Kontrol (DMSO), DSF ve pozitif kontrol olarak H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%3) ile 48 saat muamele edilen NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücrelerinin ΔΨ <sub>m</sub> indikatörü JC-1 floresan boyamasının temsili akış sitometri görüntüleri.....       | 32    |
| Şekil 4.10. Kontrol (DMSO), DSF ve pozitif kontrol olarak H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%3) ile 48 saat muamele edilen NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücrelerinin JC-1 floresan boyanma yüzdeleri.....                                                              | 33    |
| Şekil 4.11. NCI H929 U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde 48 saatlik DSF muamelesinin ardından GPX4 mRNA ekspresyon değişimi .....                                                                                                                                       | 34    |
| Şekil 4.12. NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde 48 saatlik DSF muamelesinin ardından TF mRNA ekspresyon değişimi .....                                                                                                                                        | 35    |

|                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.13.</b> NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde 48 saatlik DSF muamelesinin ardından ALOX15 mRNA ekspresyon değişimi.....  | 36 |
| <b>Şekil 4.14.</b> NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde 48 saatlik DSF muamelesinin ardından TP53 mRNA ekspresyon değişimi. ....   | 37 |
| <b>Şekil 4.15.</b> NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde 48 saatlik DSF muamelesinin ardından SLC7A11 mRNA ekspresyon değişimi..... | 38 |
| <b>Şekil 4.16.</b> NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde 48 saatlik DSF muamelesinin ardından SAT1 mRNA ekspresyon değişimi .....   | 38 |
| <b>Şekil 4.17.</b> NCI H929 hücrelerinde 48 saatlik DSF muamelesinin ardından ptgs2 mRNA ekspresyon değişimi .....                     | 39 |



## TABLO DİZİNİ

|                                                                        | Sayfa |
|------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>Tablo 3.1.</b> DNaz Muamelesi .....                                 | 22    |
| <b>Tablo 3.2.</b> DNaz PCR koşulları .....                             | 22    |
| <b>Tablo 3.3.</b> BioRad iScript cDNA sentez kiti bileşenleri .....    | 23    |
| <b>Tablo 3.4.</b> BioRad iScript PCR basamakları .....                 | 23    |
| <b>Tablo 3.5.</b> Bu çalışmada kullanılan primerlerin sekansları. .... | 24    |





## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|               |                                                             |
|---------------|-------------------------------------------------------------|
| <b>ABC</b>    | : ATP bağlayıcı kaset                                       |
| <b>ABCG2</b>  | : ATP bağlayıcı kaset süper ailesi G üyesi 2                |
| <b>CQ10</b>   | : Primer Koenzim 10                                         |
| <b>CRAB</b>   | : Multipl Miyelom Belirtileri                               |
| <b>Cu</b>     | : Bakır                                                     |
| <b>CuET</b>   | : Ditiocarb-bakır Kompleksi                                 |
| <b>DDC</b>    | : Dietilditiyokarbamata                                     |
| <b>DHODH</b>  | : Dihidroorotat Dehidrojenaz                                |
| <b>DNMT</b>   | : DNA Metiltransferaz                                       |
| <b>DSF</b>    | : Disülfiram                                                |
| <b>FBE</b>    | : Fen Bilimleri Enstitüsü                                   |
| <b>FDA</b>    | : ABD Gıda ve İlaç Dairesi                                  |
| <b>FKBP5</b>  | : FK506 Bağlayıcı Protein 5                                 |
| <b>GPX4</b>   | : Glutasyon Peroksidaz                                      |
| <b>GSH</b>    | : Redükte Glutasyon                                         |
| <b>IL-6</b>   | : İnterlokın 6                                              |
| <b>IMiD</b>   | : İmmünomodülatör ilaçların                                 |
| <b>LOX</b>    | : Lipoksijenaz                                              |
| <b>MAGE</b>   | : Melanom İlişkili Antijen                                  |
| <b>MAKÜ</b>   | : Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi                            |
| <b>MARCKS</b> | : Miristoillenmiş Alanin Açısından Zengin C-kinaz Substratı |
| <b>MDA</b>    | : Malondialdehit                                            |
| <b>MDR</b>    | : Çoklu İlaç Direnci                                        |
| <b>MDR1</b>   | : Çoklu İlaç Taşıyıcı P-glikoproteini                       |
| <b>MGUS</b>   | : Önemi Belirsiz Monoklonal Gamopati                        |
| <b>MM</b>     | : Multipl Miyelom                                           |
| <b>MtROS</b>  | : Mitokondriyal Reaktif Oksijen Türevleri                   |
| <b>NF-Kb</b>  | : Nükleer Faktörü Kappa-hafif Zincir Arttırıcısı            |
| <b>PEBP</b>   | : Fosfatidiletanolamin Bağlayıcı Protein 1                  |
| <b>P-gp</b>   | : P-glikoprotein                                            |

|                |                                        |
|----------------|----------------------------------------|
| <b>PHÖ</b>     | : Programlı Hücre Ölümü                |
| <b>PI</b>      | : Proteozom İnhibitörleri              |
| <b>PRX</b>     | : Peroksidaz                           |
| <b>RECQ1</b>   | : ATP'ye Bağımlı DNA Helikaz Q1        |
| <b>ROS</b>     | : Reaktif Oksijen Türevleri            |
| <b>SAT1</b>    | : Diamin Asetiltransferaz 1            |
| <b>SLC7A11</b> | : Sistin/Glutamat Taşıyıcı             |
| <b>SMM</b>     | : İçin İçin Yanan Multipl Miyelom      |
| <b>TF</b>      | : Transferrin                          |
| <b>TFRC</b>    | : Transferrin Reseptörü                |
| <b>UPR</b>     | : Katlanmamış Protein Yanıtı           |
| <b>VAD</b>     | : Vinkristin, Adriamisin, Deksametazon |
| <b>XBP1</b>    | : X-box Bağlayıcı Protein 1            |

# ÖZET

## Yüksek Lisans Tezi Disülfiram ile Muamele Edilen Multipl Miyelom Hücrelerinde Ferroptozis Hücre Ölüm Yolağının Araştırılması

Çağlar ARKAN

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi DİLARA AKÇORA YILDIZ  
Şubat, 2023

Multipl miyelom (MM), kemik iliğinde anormal plazma hücrelerinin çoğalması sonucu oluşan dünyada en yaygın ikinci kan kanseri tipidir. MM tedavisinde son terapötik gelişmeler MM hastalarının sağ-kalım sürelerinin artmasında oldukça etkili olmasına rağmen çoğu hastanın kaçınılmaz bir şekilde relaps ve mevcut tedavilere dirençli hale gelmesinden dolayı MM, hâlâ öldürücü maligniteler arasında yer almaktadır. Bu nedenle, MM’da maligniteyi yönlendiren farklı moleküler yolları hedefleyen yeni ajanların geliştirilmesine gerek duyulmaktadır.

Disülfiram (DSF), ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onaylı alkolizm tedavisinde yıllardır kullanılmakta ve çeşitli kanser türlerinde antikanser etkiler sergilediği bilinmektedir. Yakın zamanda, DSF’in özellikle kanser hücrelerinde ferroptozisi uyarak kanser gelişimini ve metastazını baskıladığı gösterilmiştir.

Ferroptozis, demire bağımlı artan lipid peroksidasyonu ile karakterize apoptotik olmayan düzenli bir hücre ölümü şeklidir. DSF’in MM hücrelerinde ferroptozis üzerine olan etkisi bilinmediğinden, bu tez çalışmasında DSF’in MM’da ferroptozis hücre ölümü üzerine olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

MM hücre hatlarında (NCI H929, U266 ve RPMI 8226) DSF’in antikanser etkinliği MTT yöntemi ile teyit edilmiştir. Sonrasında lipid peroksidasyon belirteci olarak kullanılan malondialdehit (MDA) miktarının tayini MDA analizi ile tespit edilmiştir. Sitozolik ROS belirteci olan H2DFCDA ve mitokondriyal membran yoğunluğunun göstergesi olan JC-1 boyalarının akış sitometrisinde değerlendirilmesi ve son olarak ferroptotik biyo-belirteçlerin mRNA ekspresyon seviyelerinin kantitatif eş-zamanlı PCR analizi ile ferroptozis araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, her üç MM hücre hattında DSF’in lipid peroksidasyonunu, sitozolik ROS’u ve mitokondriyal membran yoğunluğunu önemli miktarda artırdığını, ferroptotik biyo-belirteçlerden GPX4, transferrin SAT1 ve SLC7A11 mRNA ekspresyon seviyelerini ise azalttığını gösterdi. Sonuç olarak, elde ettiğimiz veriler DSF’in MM hücrelerinde ferroptozisi uyardığını göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** multipl miyelom, disülfiram, ferroptoz, lipid peroksidasyonu, GPX4

Hazırlanan bu Yüksek tezi Lisans Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0684-YL-20 proje numarası ile desteklenmiştir.

## SUMMARY

M. Sc. Thesis

### Investigation of Ferroptosis Cell Death Pathway in Multiple Myeloma Cells Treated with Disulfiram

Çağlar ARKAN

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

Supervisor: Assist. Prof. DİLARA AKÇORA YILDIZ  
February, 2023

Multiple myeloma (MM), the second most common type of blood cancer in the world, is caused by the proliferation of abnormal plasma cells in the bone marrow. Although recent therapeutic advances in the treatment of MM have been highly effective in increasing the survival of patients with MM, MM remains incurable, as most patients inevitably relapse and become resistant to current therapies. Therefore, there is a need to develop new agents that target different molecular pathways that drive malignancy in MM.

Disulfiram (DSF) has been widely used for years in the US Food and Drug Administration (FDA) approved treatment of alcoholism and is known to exhibit anticancer effects in various types of cancer, including MM. Recently, it has been shown that DSF suppresses cancer development and metastasis by stimulating ferroptosis, especially in cancer cells.

Ferroptosis is a regulated non-apoptotic form of cell death characterized by increased iron-dependent lipid peroxidation. Since the effect of DSF on ferroptosis in MM cells is unknown, the aim of this thesis is to investigate the effect of DSF on ferroptosis cell death in MM.

After the anticancer activity of DSF in MM cell lines (NCI H929, U266 and RPMI 8226) was confirmed by the MTT method, the determination of the amount of malondialdehyde (MDA) used as a lipid peroxidation marker, H2DFCDA, which is a cytosolic ROS marker, and JC1, which is an indicator of mitochondrial membrane density, were evaluated in Flow Cytometry. Finally, mRNA expression levels of ferroptotic biomarkers were determined by quantitative simultaneous PCR. The results showed that DSF significantly increased lipid peroxidation, cytosolic ROS, and mitochondrial membrane density in all three MM cell lines, and decreased the mRNA expression levels of ferroptotic biomarkers GPX4, transferrin SAT1, and SLC7A11. In conclusion, our data show that DSF stimulates ferroptosis in MM cells.

**Keywords:** multiple myeloma, disulfiram, ferroptosis, lipid peroxidation, GPX4

The present M.Sc. Thesis was supported by Burdur Mehmet Akif Ersoy University Scientific Research Projects Coordinatorship Under the Project number of 0684-YL-20.

## 1. GİRİŞ

Multipl miyelom (MM), kemik iliğinde klonal plazma (miyelom) hücrelerinin anormal proliferasyonu ve bu miyelom hücrelerinin aşırı ürettiği tek tip immünglobülinlerin (antikorların) neden olduğu uç organ hasar kriterlerinin varlığı (hiperkalsemi, böbrek yetmezliği, anemi, kemik lezyonları) ile karakterize olgun bir B hücreli neoplazmdır (Blade vd., 2022). İmmünomodülatör ilaçların (IMiD'ler), proteozom inhibitörlerinin (PI'ler) ve anti-CD38 antikorlarının piyasaya sürülmesi gibi son terapötik gelişmeler, yeni teşhis edilmiş (YT) MM'lu hastaların sağ-kalım sürelerini büyük ölçüde iyileştirmiştir (Hanamura, 2022). Bununla birlikte, hastaların yaklaşık %10-20'si teşhisten sonraki 2-3 yıl içinde hala erken ölüm yaşamaktadır (Hanamura, 2022), bu nedenle MM'da maligniteyi ve tedaviye karşı direnç oluşumunu yönlendiren moleküler yolların daha iyi anlaşılmasına gerek duyulmaktadır.

Günümüzde ilaç yeniden kullanım stratejisi (drug repurposing), uzun ve zorlu ilaç geliştirme sürecinde mevcut ilaçlara daha hızlı erişilebilirlik sağlanması ve maliyetleri düşürmesi nedeniyle kanser çalışmalarında büyük ilgi görmektedir. Disülfiram (DSF), alkol bağımlılarının tedavisinde 70 yılı aşkın süredir kullanılan geleneksel ve ucuz maliyetli bir ilaç olup, hastalar tarafından yan etkilerinin iyi tolere edildiği bilinmektedir (Fuller ve ark., 1986). DSF, midede aktif bir metabolit olan dietilditiyokarbamata (DDC), DDC ise kanda aldehit dehidrojenazlar (ALDH 1 ve ALDH 2)'ın inhibitörleri olan metabolitlerine dönüşmektedir (Jin vd., 2018). DSF, genel olarak kararlı kompleks (örn. bakır, demir, çinko) oluşturan metalleri şelatlama yeteneğine sahiptir. Son çalışmalar, DSF'in bir metaboliti olan ditiocarb-bakır kompleksinin (CuET) DSF'in antikanser etkilerinden sorumlu olduğunu ortaya koymuştur. Bu kompleks, NPL4 (bir p97/VCP segregaz adaptörü) agregasyonunu indükleyebilmekte ve ubiquitin-proteazom sistemi tarafından proteinlerin dönüşümünü bozabilmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, DSF ve metabolitlerinin bazı kemoterapötik ilaçların etkisini arttırabildiği ve DSF'in meme kanseri, kolon kanseri, melanom gibi çeşitli solid tümörlerin yanı sıra akut miyeloid lösemi dâhil olmak üzere hematolojik malignitelere karşı da oldukça etkili bir anti-kanser ilaç olabileceğini göstermiştir (Kannappan vd., 2021). Nitekim, DSF için ileri evre solid tümörlere karşı bir adjuvan tedavi veya bakır glukonat ile kombine olarak kullanımını kapsayan klinik deneyler mevcuttur (Kannappan vd., 2021). MM'da DSF'in bakır ile birlikte anti-kanser etkileri, hem in-vitro hem de in-vivo çalışmalarla gösterilmiştir (Xu vd., 2020). DSF'in özellikle ALDH aktivitesini inhibe ederek

MM dâhil farklı kanser kök hücrelerini hedeflediği rapor edilmiştir (Jin vd., 2018; Liu vd., 2021; Ni vd., 2022). Ek olarak, farklı kanser hücrelerinde kemoterapiye karşı direnç gelişiminde önemli rol oynayan ferroptozisin inhibitörü olduğu gösterilmiştir (Qiu vd., 2020; Ren vd., 2021). Sonuçta, oksidatif stresi artırarak ve nükleer faktör kappa B'yi (NFκB) ve proteazom aktivitesini inhibe ederek ve ferroptozisi uyararak kanser büyümesini baskıladığı gösterilen DSF'in MM hücrelerinde ferroptozis mekanizması üzerindeki etkileri açıklanmayı beklemektedir.

Ferroptozis, demire bağımlı apoptotik olmayan programlı hücre ölümünün bir şeklidir. Hem olmayan demir içeren lipoksijenazların aktivasyonu ve oksitlenmiş fosfolipitleri ortadan kaldıran bir selenoprotein ve antioksidan enzim olan glutatyon peroksidaz 4'ün (GPX4) eksikliği nedeniyle artan oksitlenmiş fosfolipid seviyeleri tarafından tetiklenir. Ferroptozis, diğer programlanmış hücre ölüm mekanizmalarından farklı olan spesifik sinyal yolları ve morfolojik özellikler ile kendini gösterir. Demir iyonları, Fenton reaksiyonu yoluyla mitokondriyal ROS'u (mtROS) artırır, bu da lipoksijenazların, özellikle fosfolipitlere esterlenmiş serbest çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan ve böylece hücresel membranlara zarar veren 15-lipoksijenazların aktivasyonuna neden olur (Javadov, 2022). Son dönem çalışmalar, ferroptotik hücre ölümünün tümör büyümesinin baskılanmasında önemli rol oynadığını göstermektedir. Nitekim, MM'u da içeren hematolojik malignitelerde kanser hücrelerinin ferroptozise karşı duyarlı olduğu ve bu nedenle ferroptozis mekanizmasında rol oynayan düzenleyici faktörlerin hedeflenmesinin, bu malignitelerde hastalık ilerlemesini engelleyebileceği ve/veya tedavide karşılaşılan kemodirencin üstesinden gelinmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir (Zhao vd., 2021).

Son yıllarda tedavisindeki çarpıcı gelişmelere rağmen çoğu hastanın kaçınılmaz bir şekilde relaps ve özellikle tedavide kullanılan ve bu hastalığın tedavisinde çığır açan proteazom inhibitörlerine karşı dirençli hale gelmesinden dolayı MM, hâlâ öldürücü maligniteler arasında yer almaktadır. Bu nedenle, tedavisinde mevcut kemoterapötik ajanlara karşı yanıt vermeyen veya direnç geliştirmiş MM tedavisi için yeni bir antikanser ajan olarak DSF'in kullanılması MM hastalarının sağ kalım sürelerinin uzamasına yardımcı olabilir. Bu bağlamda, DSF'in MM hücrelerinde etki mekanizmasının tam olarak aydınlatılması önem arz etmektedir. Çalışmamızda DSF'in NCI H929, U266 ve RPMI 8226 MM hücre hatlarında ferroptozis üzerindeki etki mekanizması incelenmeden önce DSF'in MM hücrelerindeki sitotoksik etkisi teyit edilmiş ve bu hücrelerde IC<sub>50</sub> değerleri bulunmuştur. Buna ek olarak, DSF IC<sub>50</sub> değerleri uygulanan MM hücrelerinde, DSF'in ferroptozisi tetikleyen lipid peroksidasyonunu arttırdığı tespit edilmiştir. Lipid peroksidasyonunun oluşumuna neden olduğu

düşünülen hücre içi ROS miktarı ve ayrıca mitokondri membran potansiyeli de DSF IC<sub>50</sub> değerleri uygulanan MM hücrelerinde akış sitometrisinde analiz edilmiş ve hem hücre içi ROS miktarının hem de mitokondri membran depolarizasyonunun arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, kontrol ve DSF uygulanan MM hücrelerindeki ferroptotik genlere ait mRNA ekspresyonundaki farklılıklar DSF'in ferroptozis üzerine etkisini daha açık şekilde göstermeye ve böylece etkili olduğu ferroptozis sinyal yollarını aydınlanmasına yardımcı olmuştur.

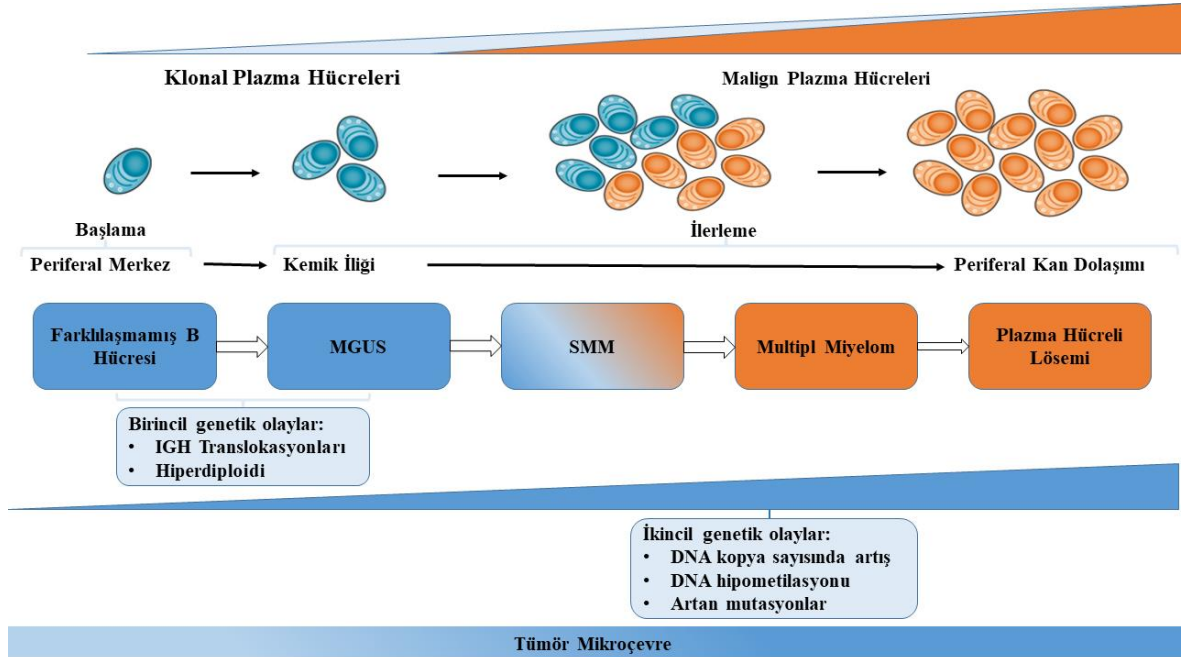


## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Multipl Miyelom

Multipl miyelom (MM), kemik iliğinde aşırı ve tek tip immünglobülin proteini salgılayan plazma hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla karakterize non-Hodgkin lenfomadan sonra en yaygın karşılaşılan ikinci hematolojik malignitedir(Siegel vd., 2016). Ayrıca, MM, tüm kanserlerin %1'ini ve tüm hematolojik malignitelerin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır (Kumar vd., 2017). MM erkeklerde kadınlara göre biraz daha sık görülmekte ve beyaz ırka kıyasla Afrikalı-Amerikalılarda iki kat daha yaygındır. Tanı anında hastaların medyan yaşı yaklaşık 65'tir (Kumar vd., 2017).

Çoğu hastada MM, anormal plazma hücreleri tarafından üretilen bir monoklonal immünoglobulin proteininin (M proteini veya paraprotein olarak da bilinir) salgılanmasıyla karakterize edilir. Ancak hastaların %15-20'sinde MM hücreleri yalnızca monoklonal serbest hafif zincirler salgılar ve hastaların <%3'ünde bu hücreler hiç monoklonal protein salgılamaz(Kumar vd., 2017). Hastalığın klinik belirtileri, monoklonal protein, habis hücreler veya habis hücreler tarafından salgılanan sitokinler tarafından yönlendirilir ve hiperkalsemi, böbrek yetmezliği, anemi ve/veya litik lezyonlu kemik hastalığı gibi son organ hasarı belirtilerini (bu topluca CRAB özellikleri olarak bilinen bir hastalık sürecinin neden olduğu lezyonlar) veya patolojik kırıkları içerir (Rajkumar vd., 2014).



Şekil 2.1. MM gelişimi



MM'lu hastaların neredeyse tamamı, önemi belirsiz monoklonal gamopati (MGUS) olarak adlandırılan asemptomatik bir pre-malign aşamadan gelişmektedir. MGUS, 50 yaş üzerindeki popülasyonun yaklaşık %5'inde mevcuttur ve prevalans beyazlara kıyasla siyahlarda yaklaşık iki kat daha fazladır. MGUS yılda %1 oranında MM'a veya ilgili maligniteye ilerler. Bazı hastalarda, sinsi sessiz MM (SMM) olarak adlandırılan orta derecede asemptomatik ancak daha ileri bir pre-malign evre klinik olarak tanınabilir. SMM belirli bir oranda MM'a ilerler. Teşhisi takip eden ilk 5 yılda yaklaşık %10, sonraki 5 yılda %3 ve sonrasında yılda %1,5. Bu ilerleme hızı, altta yatan sitogenetik hastalık tipinden etkilenir; t(4;14) translokasyonu, delesyonu(17p) ve kazancı(1q) olan hastalarda MGUS veya SMM'den MM'a ilerleme riski daha yüksektir (Kumar vd., 2017).

## 2.2. Multipl Miyelomda Tedavi Yöntemleri

MM'da erken tedaviler, melfalan ile prednizon kombinasyonu, ardından melfalan ve otolog hematopoietik kök hücre nakliyle, son on yılda, proteazom inhibitörleri ve immünomodülatör ilaçlar (IMiD'ler) talidomid, lenalidomid ve pomalidomid gibi yeni tedaviler MM hastalarında sağkalımı iyileştirmiştir. Ayrıca monoklonal antikor daratumumab ile umut verici sonuçlar da gösterilmiştir. Bu ilaçlar ayrıca immünosupresif bir ilaç olan deksametazon ile birleştirilerek kombine şekilde hastalara uygulanmaktadır (Bianchi vd., 2015; Moreau vd., 2015). Bu ilaçlarla tam yanıt oranı ve genel sağkalım iyileşmiştir (Bianchi vd., 2015). Genel sağkalımdaki bu gelişmelere rağmen, MM hastalarının birçoğunda sonunda hastalık nüks eder. Bu nüksün ana nedeni ilaç direncinin gelişmesidir (Arfani vd., 2018).

Son 10 yılda, glutamik asit ve talidomid analogunun ikinci nesil sentetik bir türevidir olan lenalidomid hem inflamatuvar bozuklukları hem de kanserleri tedavi etmek için kullanılmaktadır. Lenalidomid, in vitro olarak üç ana aktiviteye sahiptir. Bu aktiviteler, anjiyogenezin inhibisyonu, doğrudan anti-tümör etki ve immünomodülatör etkilerdir. Ayrıca, in vivo olarak, tümör hücresi apoptozisini indüklemektedir. Moleküler düzeyde, lenalidomid, ubiquitin E3 ligaz Cereblon ile etkileşime girer ve bu enzimi, Ikaros transkripsiyon faktörleri IKZF1 ve IKZF3'ü parçalamak için hedefler. Bu, lenalidomidin bir enzimin aktivitesini yeniden hedeflediği yeni bir mekanizmadır (Maffei vd., 2016). Lenalidomid, hücrel etkileşimleri ve MM'un stromal yapılara yapışmasını bozarak MM'u tedavi etmek için kullanılır. İnterlökin-6 (IL-6) gibi büyüme faktörlerinin ekspresyonunu azaltır ve hastalığın ilerlemesini engellemek için neoplastik hücrelerin apoptozisini indükler. Hematopoez düzensizliği ve kemik iliği mikroçevresine yakın artan inflamatuvar sitokin, hücre fonksiyonunun bozulmuş immün efektörüne katkıda bulunur. MM'da lenalidomid tedavisi, T hücre kusurlarını

doğrudan tersine çevirir (McDaniel vd., 2012). 26S proteazomu, hücre döngüsü ilerlemesi, apoptozis, DNA onarımı, stres tepkisi ve yanlış katlanmış ve eski proteinler dahil olmak üzere ubikuitine bağımlı protein döngüsündeki işlevi aracılığıyla hücrel homeostazda kritik bir rol oynar (Ciechanover, 2005).

Bortezomib, MM tedavisi için klinik uygulamaya giren ilk proteazom inhibitörüdür (Hideshima vd., 2001). Faz I-III denemeleri, bortezomib'in antimiyelom aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir (Orlowski vd., 2002). Faz III denemelerinden elde edilen verilere göre yanıt oranı %43 olduğu saptanmış ve bortezomib direncinin olduğu gözlemlenmiştir, bu durumda daha fazla etkinliğe sahip yeni nesil proteazom inhibitörlerine ihtiyaç duyulmuştur (Richardson vd., 2005). Carfilzomib, nükseden ve/veya refrakter MM'lu hastalarda yüksek derecede klinik aktivite sergileyen ikinci nesil bir proteazom inhibitörüdür. Proteazomu geri dönüşümlü olarak inhibe eden bortezomibin aksine, carfilzomib, proteazomun geri dönüşümsüz bir inhibitörüdür (McBride vd., 2015). Lenalidomid ve deksametazon'a carfilzomib eklenmesi, genel yanıt oranında ve progresyonsuz sağkalımda önemli gelişmelere yol açmıştır (Stewart vd., 2015). Talidomid, lenaliomid, bortezomib ve carfilzomib'den sonra yeni ajanlar şu anda klinik deneylerde araştırılmaktadır. MM hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilen antijenleri hedeflemek için monoklonal antikorların (mAb'ler) kullanılmasına dayanan yeni bir teknik ortaya çıkmıştır. Klinik deneylerdeki MAb'ler, konağın bağışıklık sistemi yoluyla veya apoptozu teşvik ederek MM hücrelerini öldürür. Mevcut tedavilerle karşılaştırıldığında, genel olarak daha iyi tolere edilebilirliğe sahip olmalarına rağmen; bu mAb'ler temini oldukça maliyetlidir ve MM'lu hastalarda uzun süreli sağkalım ve yaşam kalitesi üzerindeki etkisi bilinmemektedir (Richardson vd., 2005). Bu nedenle, MM tedavisi için yeni tedavi ajanlarının bulunmasına ihtiyaç vardır.

### **2.3. MM'da İlaç Direnci Mekanizmaları**

Günümüzde, kanserin tedavisinde karşılaşılan en büyük engel kemoterapi ve radyasyona karşı direncin gelişmesidir. İlaç direnci, içsel (birincil) direnç ya da edinilmiş (ikincil) direnç olmak üzere ikiye ayrılabilir. İçsel direnç, kemoterapiyi almadan önce, kanser hücrelerinde uygulanankanser kemoterapötiklerinin etkinliğini azaltmaktan sorumlu olan faktörlerin olduğunu gösterir. Kazanılmış dirençde ise tedavisi sırasında başlangıçta sitotoksik ilaçlara duyarlı olan ancak terapötik hedefin artan ekspresyonu ve alternatif sinyal yollarının aktivasyonu gibi çeşitli adaptif tepkiler ilaç direncinin gelişmesidir. Kanser hücreleri, hayatta kalma aktivasyonu ve ölüm sinyal yollarının inaktivasyonu ve büyüme inhibitörlerinden kaçma gibi farklı yeteneklere sahiptir ve ayrıca ilaç direnci ve hücre ölümünden kurtulmak

için çeşitli mekanizmalar geliştirir (Abraham vd., 2015). P-glikoprotein (P-gp), MM hastalarında kapsamlı bir şekilde incelenmiştir ve birçok kemoterapötik ilaca yanıt olarak ifade düzeyinin arttığı bulunmuştur. P-gp'nin artan mRNA ve protein ifadesi, MM tedavisinde kullanılan birçok ilacın hücre içi birikiminde azalmaya neden olduğu ve bu ilaçların terapötik aktivitelerini sınırladığı belirtilmektedir (Abraham vd., 2015). Hastalığın ilerlemesi sırasında artan genomik instabilite, çoklu sinyal yollarının aktivasyonuna yol açmakta ve tedavi direncine katkıda bulunmaktadır. İlaç direncinin gelişmesine ilacın hücrelere girmesinin engellenmesi, ilacın hücrelerden dışarı pompalanması veya enzimatik olarak inaktive edilmesi aracılık eder. Apoptozis ve DNA onarımı mekanizmalarındaki kusurlar da ilaç direncine katkıda bulunmaktadır. Ek olarak, ilaç hedefinin ekspresyonundaki mutasyonlar veya değişiklikler tedaviye yanıtını etkileyebilmektedir (Niewerth vd., 2015).

### **2.3.1 Glukokortikoidlere Karşı Gelişen Direnç**

Prednizon ve deksametazon, MM tedavisinde en yaygın kullanılan glukokortikoidler olmaya devam etmektedir. Steroidler, miyelom hücre hatlarının apoptozisini ve mitokondriyal transmembran potansiyelinde bir azalmayı indüklemektedir. Ayrıca, deksametazon maruziyetinden sonra kaspaz 3 kesimlenmesi ve poli (ADP riboz) (PARP-1) kesimlenmesi gözlenmiştir (Chauhan ve Anderson, 2003). Deksametazona dirençli MM hücrelerinde, C-terminali hormon bağlama alanından yoksun, tepesi kesik bir glukokortikoid reseptörü bulunmuştur (Moalli vd., 1992). Daha yakın zamanlarda, glukokortikoid reseptör geninde (NR3C1) bir transkripsiyon uzama bloğu bulunmuştur (Sánchez-Vega ve Gandhi, 2009). Deksametazon duyarlı MM.1S hücre hattında deksametazon tedavisi sonrası FK506 bağlayıcı protein 51 (FKBP5) aşırı ekspresyonu gözlenirken, deksametazon dirençli MM.1R hücre hattında FKBP5 ifadesi saptanmamıştır (Rees-Unwin vd., 2004).

### **2.3.2. Kemoterapötik Ajanlara Karşı Gelişen Direnç**

P-glikoprotein (P-gp) ve diğer çoklu ilaca dirençli proteinler gibi dışa akış proteinlerinin artan ekspresyonu, MM'da kemoterapötik ilaç direncinde önemli bir rol oynamaktadır (Schwarzenbach, 2002). P-gp, çoklu ilaca direnç proteinleri arasında en çok çalışılanıdır ve antrasiklinler ve alkile edici ajanlar dahil birçok anti miyelom ilacına yanıt olarak yüksek ifade edilir (Buda vd., 2010). VAD (vinkristin, adriamisin, deksametazon) ve melfalan bazlı kemoterapötik ajanlar gibi geleneksel kemoterapi, tümör hücrelerinde çoklu ilaç direnci (MDR) genlerinin ve P-gp'nin ekspresyonunu indükler (Buda vd., 2010). MM tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçlarının çoğu, MDR proteinleri için substratlar olarak tanımlanır ve

yüksek MDR ekspresyonuna sahip MM hücreleri, tedaviye olumlu yanıt vermemektedir (Buda vd., 2010).

P-gp'yi inhibe etmek, sitotoksik ilaçların hücre içi konsantrasyonlarını artırmak ve aktivitelerini artırmak için birkaç girişimde bulunulmuştur (Chaudhary ve Roninson, 1993). Ancak bu çalışmaların sonuçları çoğunlukla başarısız olmuştur. Başka bir seçenek de MDR proteinleri için substrat olmayan bortezomib gibi ilaçları kullanmaktır. Epigenetik olaylar ayrıca hastalık tedavi direncini de etkiler (Chi vd., 2010). Yüksek doz melfalan ve topotekan ile tedaviden sonra relaps olan hastalarda artmış ATP bağlayıcı kaset süper ailesi G üyesi 2 (ABCG2) ekspresyonu gözlenmiştir (Turner vd., 2006).

ATP'ye bağımlı DNA helikaz Q1 (RECQ1), insanlarda en bol bulunan RecQ helikazını kodlar ve potansiyel olarak DNA'ya zarar veren ajanlara karşı bir savunma görevi gören p53 tarafından düzenlenen bir gendir. RECQ1 geni, DNA metiltransferaz (DNMT) inhibitörleri tarafından aşağı regüle edilirken, MM hücrelerinde önemli ölçüde fazla eksprese edildiği belirtilmiştir (Moreaux vd., 2012). RECQ1 aşırı ekspresyonunun MM hücrelerinde ilaç direnci ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir (Viziteu vd., 2016). RECQ1 inhibisyonu, MM hücre proliferasyonunu inhibe etmekte ve apoptozisi indüklemektedir. Ek olarak, RECQ1 tükenmesi/yoksunluğu, DNA çift sarmal kırılmalarının gelişimini desteklemektedir. Buna karşılık, RECQ1 aşırı ekspresyonu, MM hücrelerini melfalan ve bortezomib sitotoksitesinin etkilerinden korur. MM'da kemoterapi direnci ile ilişkili başka bir gen, melanoma-associated antijen (MAGE) A'dır. MAGE-A gen ekspresyonu, anti-apoptotik protein Bcl-2'nin (Cho vd., 2016) farklı regülasyonu ve aşırı ekspresyonu yoluyla melfalan ve diğer ilaçlara karşı direnci arttırabilmektedir (Cho vd., 2016).

### **2.3.3. Proteazom İnhibitörlerine Karşı Gelişen Direnç**

MM tedavisi için FDA tarafından onaylanmış üç proteazom inhibitörü (PI) (bortezomib, carfilzomib ve ixazomib) mevcuttur. Proteazom inhibitörleri, katlanmamış protein tepkisine (UPR) ve nihayetinde proteazomal inhibisyon yoluyla hücre apoptozisine neden olur. UPR mekanizması, monoklonal proteinleri sentezleyen MM hücrelerinde PI'lere diğer kanserlere göre nispeten daha duyarlıdır. PI'i, nükleer faktör- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) aktivitesinin inhibisyonu, p53'ün aktivasyonu, yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi, c-Jun N-terminal kinaz aktivasyonu ve hücre döngüsü inhibitörlerinin stabilizasyonu dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla hücre ölümüne neden olmaktadır (Mitsiades vd., 2002; Obeng vd., 2006; Yarde vd. 2009). Bu ilaçlar, Fanconi anemisi/BRCA DNA onarım yolunun NF- $\kappa$ B bağımlı

upregülasyonunu önleyebilir ve alkilliyici ilaçların sitotoksik etkisini artırabilir (Yarde vd., 2009).

PI'lerle tedavi önemli sonuçlar göstermiş olsa da birincil ve ikincil direnç ortaya çıkmaktadır. Bu ilaçlarla uzun süreli tedavi, çoğu hastada ilaca dirençli nükslere yol açar. Ayrıca bazı hastalarda birincil direnç de gözlenmektedir (Qiang vd., 2016). Kimotripsin benzeri proteazom aktivitesinden fonksiyonel olarak sorumlu olan  $\beta 5$  proteazomal alt birim (Oerlemans vd., 2008), proteazom inhibitörleri bortezomib ve carfilzomib (Verbrugge vd., 2012) aktivitesi için birincil hedeftir.  $\beta 5$  alt biriminin aşırı ekspresyonu, bortezomib-dirençli hücre hatlarında gözlemlenen en sık değişiklik olmuştur (Chen ve Rotenberg 2010; Finlayson ve Freeman 2009; Li vd., 2009; Micallef vd., 2009). MM'de PI'ne direncin olası nedeni olarak  $\beta 5$  proteasomal alt birimini kodlayan PSMB5 geninin nokta mutasyonlarının varlığını göstermektedir. Bu anormallik, proteazom inhibitörü bağlanma bölgesinde nokta mutasyonlarına neden olur (Niewerth vd., 2014).

Miristoillenmiş alanin açısından zengin C-kinaz substratı (MARCKS) membran proteinidir. Hücre adezyonunda ve metastatik yayılımda önemlidir (Chen ve Rotenberg 2010; Finlayson ve Freeman 2009; Rückrich vd., 2009). MARCKS ekspresyonu, birçok kanser türünde önemli ölçüde yüksektir (Suzuki vd., 2011). Bortezomib'e dirençli hastalarda artan ekspresyonu gösterilmiştir (Yang vd., 2015). Ek olarak, MARCKS fosforilasyonunun inhibisyonu, bortezomib-dirençli insan MM CCRF-CEM lösemi hücrelerinde bortezomib duyarlılığını arttırmış, benzer etkiler MM ksenograft modelinde elde edilmiştir (Huber vd., 2015). Franke ve diğerleri, MARCKS proteininin ubikuitin içeren veziküller ile ilişkili olduğunu ve bortezomib-duyarlı lösemi hücrelerine kıyasla ex vivo bortezomib dirençli neoplastik hücrelerde daha belirgin olduğunu göstermektedir (Franke vd., 2012; Huber vd., 2015).

X-box bağlayıcı protein 1 (XBP1) yüksek ekspresyonunun, MM'da bortezomib direncinin bir belirteci olduğu bulunmuştur (Leung-Hagesteijn vd., 2013). MM'da Xbp1 geninin baskılanması, plazma hücresi olgunlaşması ve immünoglobulin üretimi ile bortezomib direncini indüklemektedir. XBP1, plazmablastların plazmasitlere son olgunlaşmasından ve immünoglobulin sekresyonunun indüklenmesinden sorumlu olan, plazma hücrelerine B hücresi farklılaşması için gerekli olan önemli bir transkripsiyon faktörüdür (Li vd., 2015). XBP1 ayrıca UPR mekanizmasında önemli bir düzenleyicidir. XBP1, ER stresini ve UPR aktivasyonunu azaltmak için gerekli genleri aktive eden aktif bir izoformdur. Düşük XBPS1 ifadesinin, PI tedavisine duyarlılık eksikliği ile ilişkili olduğu bulunmuştur. XBP1 yapısında mu-

tasyon görülen hücreler, bortezomib'e karşı duyarlılıklarını kaybederek hastalık direncini indükler (Abdi vd., 2014). PI direncinin daha genel bir farmakokinetik mekanizması, artan ilaç taşınımıdır.

İlaç akış pompaları veya ABC taşıyıcıları, ilaçları ve bunların metabolitlerini hücre içi boşluktan hücre dışı boşluğa taşıyabilmektedirler. Artan ilaç taşınımı, ilaçların hücre içi hedefleriyle etkileşime girmesini önleyerek ilaç direncinin gelişmesine yol açar. Carfilzomib ve bortezomib, çoklu ilaç taşıyıcı P-gp (MDR1) substratlarıdır (O'Connor vd., 2013). MDR1, PI tedavisine yanıt olarak ifade seviyesinde artış ile düzenlenir ve ayrıca PI'ye uyarlanmış MM hücre hatlarında da tanımlanmıştır. MDR1 inhibisyonu, MM hücrelerini in vitro olarak PI'lere karşı yeniden duyarlı hale getirmektedir, ancak klinik olarak çok fazla yan etki göstermektedir (Abraham vd., 2015). Bu nedenle, farklı bir yaklaşıma ihtiyaç vardır. Nima ile ilişkili protein kinaz 2 (Nek2) birçok ABC yolunu kontrol eder ve çeşitli çalışmalar yoluyla PI direnci ile ilişkilendirilmiştir (Gu vd., 2018).

#### **2.4. Programlanmış Hücre Ölüm Tipleri**

Programlı hücre ölümü (PHÖ), embriyogenez, doku homeostazı, immün yanıt ve normal gelişim süreçlerinin temelini oluşturmakta ve kanser gibi hiperproliferatif hastalıkların önlenmesinde kritik rol oynamaktadır (Allocati vd., 2015). Apoptozis, piroptozis, parthanatos, nekroptozis ve ferroptozis gibi çeşitli PHÖ türleri tanımlanmıştır. Apoptozis, evrim sürecinde korunan gelişme, homeostaz, enfeksiyon ve patogenez sırasında meydana gelen bir hücre ölümü şeklidir. Bu nedenle, memeli hücrelerinde ölümün düzenlenmesi kaspaz aktivasyonunun temel adımlarından kaynaklanır (Fuchs ve Steller, 2011).

Piroptozis, sıklıkla inflamatuvar kaspaz aktivasyonunun bir sonucu olarak, hücre zarında gözenek oluşturan gasdermin protein ailesinin üyeleri tarafından yönlendirilen bir PHÖ tipidir (Galluzzi vd., 2018). Piroptozisde, hücre zarı parçalanmadan önce hücre şişer ve zarda gözenekler oluşur ve böylece hücre zarı bütünlüğünün kaybedilmesine neden olur, böylece hücre içi içerik serbest bırakılır ve nükleer büzülme ve DNA kırılmaları ile birlikte inflamatuvar cevaba yol açar (Bergsbaken vd., 2009).

Parthanatos, kaspazla ilgisi olmayan bir tür PHÖ'nü aktive eden poli [ADP-riboz] polimeraz-1'e (PARP-1) dayanır. Çeşitli nörolojik hastalıklarda önemli rol oynadığı belirtilen parthanatos, büyük miktarlarda DNA fragmanları üreten kromatin yoğunlaşması ile karakterize edilir (Wang vd., 2009).

Nekroptosis, reseptör etkileşimli protein kinaz 1 veya 3'ün (RIPK1 veya RIPK3) aktivasyonunu içerir (Vandenabeele vd., 2010). ATP ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesi, kalsiyum yüklenmesi, mitokondriyal geçirgenliğin artması, gözeneklerin açılması, artan hücre hacmi, organel şişmesi, plazma zarı yırtılması ve ardından hücre içeriğinin sızması şeklinde gerçekleşir (Berghe vd., 2014; Christofferson ve Yuan 2010; Yuan ve Kroemer 2010).

Erastin ve RSL3 (onkojenik-RAS-seçici öldürücü bileşikler), karsinojenik RAS mutant hücre hatlarına seçici olarak sitotoksik olan iki farklı ferroptosis indükleyicisidir. RSL kaynaklı hücre ölümü, azalan hücrel demir alımı veya demirin şelasyonu ile inhibe edilen artan ROS üretimi ile ilişkilidir. Buna göre, hücre redoks homeostazının bozulmasına yol açan demire bağımlı hücrel ROS birikiminin neden olduğu hücre ölümüne ferroptosis denir (Dixon vd., 2012; Dolma vd., 2003; Yang ve Stockwell, 2008). Transmisyon elektron mikroskobu altında, erastinle işlenmiş HRAS mutantları, klasik morfolojik özelliklere bağlı olarak apoptozis (kromatin yoğunlaşması ve marjinalleşme), nekrozis (sitoplazma ve organel şişmesi ve plazma zarı yırtılması) veya otofajiye (çift zarlı kapalı veziküllerin oluşumu) uğramaz; bununla birlikte mitokondri, zar yoğunluğunda bir artış gösterir (Dixon vd., 2012; Shaw vd., 2011).

Ferroptosis hücre ölümü, farklı fenotipik, biyokimyasal özelliklere ve düzenleyici faktörlere sahiptir. Ferroptosisin kanser, nörodejenerasyon, doku hasarı ve enfeksiyonla ilişkili olduğu gösterilmiştir (D. Tang vd., 2021). Kanser hücrelerinde metabolik yeniden programlanmanın ferroptosis'e karşı kazanılmış duyarlılıkla ilgili olduğu belirtilmiş, bu nedenle ferroptosisi hedeflemenin tümör baskılanmasında önem arz edeceği belirtilmektedir (Jiang vd., 2021).

## 2.5. Ferroptosis Oluşumu

Lipid peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından yürütülen bir pozitif geri besleme zincir reaksiyonudur; Süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ), peroksit ( $H_2O_2$  ve  $ROOH$ ) ve serbest radikaller ( $HO^{\cdot}$  ve  $RO^{\cdot}$ ) dahil olmak üzere ROS, çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu başlatır. Hidrojen peroksit, Fenton reaksiyonu olarak adlandırılan serbest radikal lipid peroksidasyonunun temeli olan  $Fe^{+2}$ 'nin katalitik etkisi altında hidroksil radikallerini ( $HO^{\cdot}$ ) oluşturur (Cheng ve Li 2007; Papa vd., 2012).  $HO^{\cdot}$ , Fenton reaksiyonunun redoks döngüsü yoluyla üretilir ve Haber-Weiss reaksiyonu aracılığıyla kapalı bir döngü oluşturur (Ayala vd., 2014; Brigelius-Flohé ve Maiorino 2013). Hidrojen peroksit, glutatyon peroksidaz (GPX), peroksidaz (PRX) ve katalazın sinerjistik etkisi yoluyla su ve oksijene indirgenebilir (Sullivan ve

Chandel, 2014). Hidroksil radikalleri ( $\text{OH}^\cdot$ ) ve hidroperoksitler ( $\text{ROO}^\cdot$ ), oksidatif stres sırasında lizozomal membranların bütünlüğünü tehlikeye atarak hücre sağkalımını (Terman ve Kurz, 2013) ve lipidleri (Ayala vd., 2014; Hassannia vd., 2019) etkileyen en yaygın iki ROS'dur. Oksidatif stres kaynaklı lipid peroksidasyonu, ferroptozisin temelidir. Lipid peroksitler, ROS'un çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar) üzerindeki oksidatif saldırısıyla üretilir (Conrad vd., 2018). İlk adım, RO üretimidir, ardından yeni bir  $\text{RO}^\cdot$  (yeniden üretim) (Cheng ve Li 2007; Imai ve Nakagawa 2003; Yin vd., 2011) üretimi gelir. Son adım, antioksidanlarla reaksiyonu durdurmaktır (Feng ve Stockwell, 2018). Enzimatik lipid peroksidasyonu, lipoksijenaz (LOX) ailesinin (Haeggström ve Funk, 2011) ve LOX15'in bir iskele proteini olan ve doğrudan ferroptozu teşvik eden (Wenzel vd., 2017) fosfatidiletanolamin bağlayıcı protein 1'in (PEBP1) aktivitesi aracılığıyla gerçekleşir. Glutasyon peroksidaz 4 (GPX4), membrandaki hidroperoksidi azaltabilen,  $\text{ROOH}$ 'yi  $\text{R}^\cdot$ 'ye indirgeyen ve lipid otooksidasyon reaksiyonunu kesintiye uğratan tek GPX'tir (Brigelius-Flohé ve Maiorino, 2013).

### 2.5.1. Ferroptozis Metabolik Yolu

Ferroptozis, glutasyon (GSH) ve GPX4'ün redoks içeriğini aşan ROS birikimine bağlı lipid peroksidasyonundan kaynaklanır (Qiu vd., 2020). Demir, lipidler ve ROS hücre sağkalımında yeri doldurulamaz bir rol oynar. GPX4 ve CoQ10, antioksidan metabolizmasının iki paralel yoludur.

### 2.5.2. Antioksidan Metabolizması

Antioksidan metabolizmasının dengesi dinamik olarak, tümü ferroptozisi inhibe edebilen kimyasal olarak indirgenmiş ve oksitlenmiş bir durumda bulunan metabolit molekülü içeren GPX4, koenzim CQ10 ve dihidroorotat dehidrojenaz (DHODH) tarafından dinamik olarak korunur. GPX4, hücre zarındaki hidroperoksidi azaltan ve temel bir kofaktör olarak GSH'yi kullanan bir selenoproteindir (Brigelius-Flohé ve Maiorino, 2013). Glutamin-sistein sentaz aktivitesi, sistein konsantrasyonu ve GSH geri besleme inhibisyonu, doğrudan GSH sentezini düzenler, böylece GPX4'ün enzimatik aktivitesini etkiler (Bebber vd., 2020; Guan vd., 2009; Hatem vd., 2017). *Sistem Xc* ve trans-sülfürizasyon yolu, sisteinin iki ana kaynağıdır. Heterodimerler SLC7A11 (xCT) ve SLC3A2'den (4F2hc) oluşan sistin/glutamat taşıma *sistemi Xc*, sistini (sistini) 1:1 formunda alır ve hücre içi glutamatı salgılar (Conrad ve Sato 2012; Dixon vd., 2012; Ishii vd., 1987). SLC7A11, aşırı demir yükü ferroptozisini (Wang vd., 2017) düzenlemek için anahtar merkezdir. Glutamat, GSH'nun sentezi için gerekli olan bir başka önemli ham maddedir ve alımı esas olarak sistin/glutamat taşıma kompleks *Sistem Xc*'e bağlıdır (McGivan, 2007). Glutamat-sistein ligaz katalitik alt birimi, sistein



ve glutamatin bağlanması yoluyla glutatyon sentezindeki ilk adımı katalize eder. Bununla birlikte, sistein yetersiz olduğunda, GCLC,  $\gamma$ -glutamil peptitlerinin ( $\gamma$ -Glu-AA'lar) sentezini teşvik ederek glutamati ortadan kaldırır ve ferroptozisi önler (Kang vd., 2021). Genel olarak, hem selenosistein biyosentezi/alımı (Alim vd., 2019; Ingold vd., 2018) hem de GSH sentezi (Anderton vd., 2017; Zhou vd., 2020) GPX4'ün homeostazını etkiler, bu da GPX4'ün ferroptozisi düzenlemede çok önemli bir rol oynadığına işaret eder.

### 2.5.3. Demir Metabolizması

Biyoelementlerden biri olarak, oksijen açısından zengin bir ortamdaki demir, farklı tipte fosfolipid hidroperoksitler ve lipid (yağ asidi) hidroperoksitler ile Fenton reaksiyonu yoluyla ROS üretebilir (Dixon ve Stockwell, 2014). Kanda dolaşan  $Fe^{+3}$ , transferrine (TF) bağlanarak ve transferrin reseptörünün (TFRC) aracılık ettiği endositoz yoluyla hücrelere taşınır.  $Fe^{+3}$  hücrelere alındıktan sonra, prostat 3'ün altı transmembran epitelyal antijeni (STEAP3) ferrozomlar üzerindeki etkisi ile  $Fe^{+2}$ 'ye indirgenir. İki değerlikli metal taşıyıcı (DMT1), ferrozomlardan kararsız demir havuzu (LIP) ortamına  $Fe^{+2}$  salınımına aracılık eder (Fang vd., 2020; Muñoz, García-Erce ve Remacha 2011; Yanatori ve Kishi 2019; Zhou vd. 2020). Demir hücre içinde genel olarak ferritin veya hem de depolanabilir. Ferritin iki alt birim içerir: FTL (hafif zincir) ve FTH1 (ağır zincir) (Bradley vd., 2016). Nükleer reseptör ko-aktivatörü 4 (NCOA4), "ferritinofaji" için lizozomları hedefleyen ferritin kompleksini oluşturmak üzere doğrudan FTH1'e bağlanır, ferritinin degradasyonunu teşvik eder ve demir eksikliği sırasında hücre içi serbest demiri artırır (Dowdle vd., 2014; Mancias vd., 2014).

### 2.5.4. Lipid Metabolizması

Lipit üretimi, hayatta kalmanın temelidir ve lipid peroksidasyonu, ferroptozisin bir biyobelirticidir (Z. Tang vd., 2021). Ferroptozis sürecinde lipid peroksidasyonu, asil-CoA sentetaz uzun zincirli aile üyesi 4 (ACSL4), lizofosfatidilkolin asiltransferaz 3 (LPCAT3) ve araşidonik asit 15-lipoksijenaz (ALOX15) gerektirir. Lipoksijenazlar (LOX'ler), çoklu doymamış yağ asitlerine (PUFA) karşılık gelen hidroperoksitlere oksitleyebilir. Memeli hücrelerinde, linoleik asit ve araşidonik asit, LOX'larda en çok bulunan çoklu doymamış yağ asidi substratlarıdır (Haeggström ve Funk, 2011; Zhao vd., 2008). PUFA'lar, ferroptozis sırasında peroksidasyona en yatkın olan lipidlerdir (Yang vd., 2016). Asetil-koenzim A karboksilaz (ACC), yağ asidi sentezinde yer alan bir enzimdir ve doğrudan asil-CoA'dan PUFA'ları sentezler. PE-AA, LOX15 ve  $Fe^{+2}$ 'de kullanılabilen çoklu doymamış bir yağ asidi PUFA'dır. Oksitlenmiş fosfolipid ox-PE'nin katalitik üretimi, ferroptozis gelişimine katkıda bulunur (Shimada vd., 2016; Yuan vd., 2016).

## 2.6. TP53'ün Ferroptozisdeki Rolü

Tümör baskılayıcı protein p53, çeşitli streslere yanıt olarak hücre bölünmesini veya hayatta kalmayı engelleyen bir transkripsiyon faktörüdür ve hücrel anti-kanser savunmalarının kilit mekanizması olarak hareket eder (Kasthuber ve Lowe, 2017). TP53 proteininde oluşabilecek mutasyonlar kanser gelişimine doğrudan katkıda bulunabilmektedir (Donehower vd., 2019). TP53 üzerinde raslanan en yaygın mutasyon DNA bağlanma alanında meydana gelir ve transkripsiyon faktörü fonksiyonlarının inaktivasyonu ile sonuçlanır. Bu durumda TP53 onkogenik fonksiyon kazanarak hücrelerin apoptozise gitmesi engellenmiş olur (Donehower vd., 2019). Genomun koruyucusu olan TP53, yalnızca çeşitli stresler altında hücre bölünmesinin ve hayatta kalmanın kontrolüne katılmakla kalmaz, aynı zamanda hücre apoptozisi, otofaji ve ferroptozisi de düzenler (Mandal vd., 2015). SAT1 geni, TP53'ün transkripsiyonel hedefidir. Önceki çalışmalar, AdSAT1 (anahtar poliamin katabolik enzim SAT1'i kodlayan bir adenovirüs) transdüksiyonu tarafından indüklenen poliamin tükenmesinin, mitokondriyal distorsiyonlar tarafından indüklenen intrinsik yoluyla apoptozisi tetiklediğini öne süren güçlü kanıtlar sağlamıştır (Ou vd., 2016). Qu ve ark., SAT1'in, TP53 aracılı reaktif oksijen türleri (ROS) yanıtının ve sistin alımının kısıtlanması, glutatyon sentezinde bir azalma ve birikimin neden olabileceği ferroptozisin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermişlerdir (Ou vd., 2016; Youssef ve Miller, 2020). Son zamanlarda yapılan birkaç araştırmadan elde edilen veriler, demir eksikliğinin farklı hücre tiplerinde SAT1 ekspresyonunu yukarı regüle ettiğini vurgulamıştır (Mou vd., 2022).

## 2.7. Ferroptoziste ptgs2'nin Rolü

Siklooksijenaz olarak da bilinen prostaglandin-endoperoksit sentaz (ptgs2), prostaglandin biyosentezinde anahtar enzimdir ve hem dioksijenaz hem de peroksidaz olarak işlev görür (Gao vd., 2022).

## 2.8. Disülfiram (DSF)

Yeni ilaç geliştirmenin yüksek maliyetleri, başarısızlık oranı ve uzun test süreleri göz önüne alındığında çeşitli hastalıkların tedavisi için FDA tarafından onaylanmış ilaçların aday anti-kanser ajanları olarak yeniden kullanılması daha hızlı ve daha ucuz bir alternatif seçeneği temsil etmektedir (Pantziarka vd., 2014). Umut vaat eden anti-kanser etki gösteren ilaçlar arasında alkol bağımlılığının tedavisinde 70 yıldan fazla süredir kullanılan DSF bulunmaktadır (Iljin vd., 2009). DSF, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA)'nin tavsiye ettiği dozda güvenlik ve toleransa sahip bir ilaçtır (Cvek, 2012).



apoptozla ilişkili genlerin ifadesinin arttığı belirtilmiştir (Xu vd., 2020). Nazofarinjial karsinom (NPC) hücreleri DSF ile muamele edildiğinde ise ferroptozis yoluyla ilişkili genlerin ekspresyon düzeylerinde artış olduğu belirtilmiştir (Li vd., 2020).

DSF'in, klinik öncesi modellerde anti-kanser aktivitesi gösterdiğinden (Chen vd., 2006; Iljin vd., 2009; Liu vd., 2014; Safi vd., 2014; Zha vd., 2014) ve bir klinik deneyde yüksek riskli meme kanserini tedavi etmek için adjuvan DTC kullanıldığından (Dufour vd., 1993), DSF onkolojide ilaç yeniden kullanım için bir aday olarak ortaya çıkmaktadır. DSF'nin ek avantajları, DSF'a duyarlı geniş bir malignite yelpazesini ve ayrıca kanser kök hücrelere hedef alma kabiliyetini içermektedir (Yip vd., 2011).



### **3. MATERİYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. GEREÇ**

##### **3.1.1. Multiple Miyelom (MM) Hücre Hatları**

İnsan MM hücre hatları olan NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücreleri ATCC hücre kültürü koleksiyonundan TÜBİTAK 113Z383 Kariyer Destek Projesi kapsamında ATCC'den temin edilmiştir.

##### **3.1.2. Kimyasallar ve Kitler**

RPMI 1640, with Stable Glutamine (CAPRICORN SCI), FBS (CAPRICORN FBS-HI-11A) ve Penisilin-Streptomisin (Pen-Strep, 10,000 U/ml) (ThermoFisher Scientific) hücre kültür ortamının oluşturulmasında kullanılmıştır. PBS 1X, Trypsin 0,05%/ EDTA 0,53mM in HBSS 1X (WISSENT MULTICELL) hücrelerin pasajlanması aşamasında kültür ortamından hücrelerin uzaklaştırılması için kullanılmıştır. RNA izolasyonu aşamasında NucleoZOL, one phase RNA purification (MACHEREY NAGEL) RNA izolasyon kiti kullanılmıştır. cDNA sentezinde iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) kullanılmıştır.

Primerler, (Sentebiolab) istenilen gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılmıştır. Blastaq 2X qPCR MasterMix (Applied Biological Materials) qPCR reaksiyonunun gerçekleştirilmesinde kullanılmıştır. Dimetil Sülfoksit (DMSO)(Cryo-Sure) cell culture grade (BIOMATIK) DSF'ın çözündürülmesinde ve toksik etkisinden dolayı deney aşamalarında kontrol grubuna eklenmiştir. Trikloroasetik Asit ve Tiyobarbitürik Asit MDA analizinin gerçekleştirilmesinde kullanılmıştır.

##### **3.1.3. Cihazlar**

Buzdolabı -80 (Thermo Scientific) kimyasal ve numunelerin uzun süreli saklanması için kullanılmıştır. Buzdolabı +4 /-20 (beko) kimyasal ve kitlerin stabil şekilde saklanması için kullanılmıştır. Hücrelerin kültür ortamının sağlanmasında İnkübatör (Thermo Electron Corporation) kullanılmıştır. Laminar Akışlı Steril kabin (Nuanre) hücre kültüründe olası kontaminasyon risklerinin en aza indirgenmesi için hücre kültürü çalışmalarının ve bazı kimyasal çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır. Mikroskop (Olympus) hücrelerin sağlığının kontrol edilmesinde ve hücre sayımının yapılmasında kullanılmıştır. Hücrelerin pasajlanması veya besi ortamından uzaklaştırılması için MikroSantrifüj (Beckman) kullanılmıştır. Epoch Mikropilaka Spektrofotometre (BioTek) RNA saflığının belirlenmesinde, MTT ve

MDA analizlerinin sonuçlarının elde edilmesinde kullanılmıştır. PZR Cihazı (Biorad) primerlerin TM sıcaklıklarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Pipet Seti (Eppendorf) hassas ölçümlerin yapılmasında ve deney setlerin kurulmasında kullanılmıştır. Gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için qPCR analizleri Light Cyclers 480 -II (Roche) cihazında gerçekleştirilmiştir.



## 3.2. YÖNTEM

### 3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Sıvı azot tankında muhafaza edilen NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücreleri 37°C'lik su banyosunda ısıtılarak hızlıca %10 FBS içeren besiyeri içerisine alındı. 800 xg'de 5 dk santrifüj edilerek DMSO içeren dondurma medyumunu uzaklaştırıldı. Hücreler T25 hücre kültür kaplarına alındı ve ml başına  $5 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Yatay bir şekilde T25 hücre kültür kabı 37°C'de inkübatöre kaldırıldı. Mikroskopta hücre yoğunluğu ve morfolojisi kontrol edildikten sonra pasajlama işlemleri 2-3 günde bir gerçekleştirildi.

### 3.2.2. Disülfiram Stok ve Uygulama Solüsyonlarının Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan DSF Selleckchem firmasından (S1680) ticari olarak temin edilmiştir. Firma talimatlarına göre DSF steril DMSO içerisinde 200 mM ana stok çözeltisi olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu ana stok çözeltisi, 0.5 mL'lik steril ependorf tüplere bölünerek -80 °C saklanmıştır. Çalışmalar sırasında 200 mM ana stoktan 1 mM ara stoklar PBS içerisinde hazırlanmış ve sitotoksikite çalışmaları bu ara stoklar kullanılarak yapılmıştır.

### 3.2.3. MTT Yöntemi ile Canlılık Tayini

Yetmiş beş cm<sup>2</sup>'lik hücre kültür kaplarında kültürleri yapılan MM hücreleri, 96 kuyucuklu plakalara (96 well plate) aktarılmadan önce hücre sayısının tespiti için Tripan mavisi (1/1 oranında) ile boyandı. Tripan mavisi ile boyanan hücrelerin ölü, boyayı almayan hücrelerin ise canlı olduğu kabul edilen bu testte hemositometre lamında ml başına düşen canlı hücre sayısı hesaplandı. Hücreler, besiyeri içerisinde her bir kuyucuğa 90 µl hacimde  $4 \times 10^4$  olacak şekilde 96-kuyucuklu plakalara çok kanallı otomatik pipet ile dağıtıldı. MM hücreleri süspanse hücreler olduğundan plate yüzeyine tutunmaları için 24 saat beklenilmeden çalışmaya devam edildi. DSF için belirlenen konsantrasyonlarda ve %5 DMSO (kuyucuğa eklendiği zaman konsantrasyonu %0,5 olmaktadır) her bir kuyuya 10 µl olacak şekilde hücrelere uygulandı ve 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde inkübasyona bırakıldı. 48 saat sonra 5 mg/ml MTT solüsyonundan her bir kuyucuğa 10 µl eklendi. Hücreler 2-4 saat inkübe edildikten sonra kuyucuklara 100 µl MTT lizis solüsyonu (%10 SDS, 0,03N HCl) eklendi. Plate gece boyunca 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde inkübasyona bırakıldı ve ertesi gün sabah EPOCH plate reader ile 570 nm absorbans değerinde spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Elde edilen absorbans değerleri % canlılık olarak hesaplandı. Kontrol grubundan elde edilen değer %100 canlılık olarak alındı ve diğer dozlar kontrol grubu ile karşılaştırıldı ve her bir doz

için hücre sağ kalım-ölüm oranı hesaplandı. Hücrelerin yarısının öldüğü letal doz Graphpad Prism8 uygulaması kullanılarak hesaplandı. Deney seti her seferinde 3 tekrarlı olacak şekilde yapıldı ve her deney seti en az 3 farklı zamanda tekrarlanarak elde edilen sonuçların tutarlılığı doğrulandı.

#### 3.2.4. MDA Analizi

Reaktif oksijen türlerinden kaynaklanan oksidatif stresin hücrelerde hasara neden olduğu mekanizmalardan biri de lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonu, hücre zarı hasarına ve toksik reaktif yan ürünlerin oluşumuna neden olabilir. Lipit peroksidasyonu, lipid hidroperoksitleri ve malondialdehit (MDA) gibi aldehitlerin ürünleri, bir tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) tahlili ile ölçülebilir. Hem hücre kültürü ortamında hem de hücre lizatında gerçekleştirilen bu tahlilde MDA, tiyobarbitürik asit (TBA) ile 1:2 oranında birleşir. Bu birleşme sonucunda 535 nm dalga boyunda maksimum absorbans veren pembe renkli bir son ürün oluşur.

MDA analizi için, öncelikle MDA standartları hazırlanır. Standartlar 20 nmol/mL, 10 nmol/mL, 5 nmol/mL, 2.5 nmol/mL, 1.25 nmol/mL ve 0.625 nmol/mL olacak şekilde 20 nmol/mL ana stoğundan seri dilüsyonlar şeklinde taze olarak hazırlanır. DSF muamelesinden sonra hücreler kültür ortamından santrifüj yardımıyla ayrılır. Bu aşamada hem besi yeri hem de hücre pelleti ayrı tüplere konulur. Hücre pelletine %2,5 oranında hazırlanan Trikloroasetik Asit (TCA) çözeltisinden 200 µL eklenir ve pellet iyice çözündürülür. Sonrasında hücre pelleti içeren tüpler 13000 xg'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant temiz tüpe alınır. Hücre pelletleri üzerine RİPA solüsyonu eklenir ve -20°C'ye kaldırılır, sonraki aşamalarda bu peletten protein izolasyonu yapılacaktır. Bu aşamadan sonra standart tüplerine, hücre kültür ortamına ve hücre pelletleri üzerinden alınan %2,5 TCA solüsyonu üzerine 400 µL %15 oranında TCA çözeltisi ve 800 µL %0,67 oranında Tiyobarbitürik Asit çözeltisi eklenir ve tüm tüpler vortekslenerek 95°C su banyosunda 30 dakika inkübe edilir. 30 dakikanın sonunda tüpler buz üstüne alınarak soğutulur ve tüm tüplere 3 mL n-bütanol eklenir ve tüpler karıştırılarak 10000 xg'de 10 dakika santrifüjlenir. Reaksiyon tüplerinde TBA-MDA birleşimi n-bütanol fazında pembe renk oluşturur. Dikkatlice üst fazdan 200 µL 96 kuyucuklu plakaya aktarılır ve 535 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapılır. Standart grafiği oluşturularak çalışma gruplarındaki MDA miktarı hesaplanır. Bu aşamada doğru sonuçlar elde etmek için deney başında RİPA solüsyonuna alınan peletlerden protein izolasyonu yapılır. Çalışma gruplarındaki toplam protein miktarı hesaplanır ve MDA/toplam protein formülü kullanılarak MDA miktarı hesaplanmaktadır.



### 3.2.5. Akış Sitometri ile Mitokondriyal Membran Potansiyeli ve Stoplazmik ROS Miktarının Tayini

MM hücreler DSF IC<sub>50</sub> değerleri uygulaması yapıldıktan ve 48 saatlik inkübasyondan sonra hücreler toplanarak 1500 rpm’de 5 dk. santrifüj edildi. Hücreler daha sonra bir kez PBS ile yıkanarak tekrar santrifüj edildi. Hücreler karanlık ortamda 250 µL hacimde 5 µM oranında hazırlanmış olan H2DCFDA ve JC-1 ile süspanse edildi. Akış sitometri cihazının kompanzasyonu için kontrol grupları oluşturuldu. Hücreler 37 °C’de karanlık bir ortamda 30 dk. inkübasyona bırakıldı. Sonrasında akış sitometri cihazında analiz edildi. Hazırlanan kontrol grupları ile cihaz kompanzasyon ayarları yapıldıktan sonra her bir örnek ayrı ayrı analiz edilerek veriler alındı. Daha sonra elde edilen veriler analiz edildi.

### 3.2.6. Total RNA İzolasyonu

NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücrelerinden 1.5x10<sup>6</sup> hücre, kontrol ve DSF grubu olmak üzere 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildi. NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücrelerine ait sırasıyla 29 µM, 124 µM ve 108 µM olan DSF IC<sub>50</sub> dozları eklendi, kontrol gruplarına ise ilaç oranının eşit miktarı kadar DMSO eklendi. Kırksekiz saat süren inkübasyonu takiben hücrelerden total RNA izolasyonu NucleoZOL reaktifi kullanılarak gerçekleştirildi. Santrifüj edilen hücreler PBS ile yıkandı ve yıkanan bu hücrelerin üzerine 500 µl NucleoZOL ve 200 µl RNaz/DNaz içermeyen su ilave edildi. Daha sonra, tüpler 15 saniye kuvvetlice çalkalandı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra 12.000 g’de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant 500 µl yeni eppendorf tüpüne aktarıldı. Tüpe aktarılan süpernatantın üzerine 500 µl İzopropanol ilave edildi ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Sonra, tüpler 12.000 g’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı ve pellete % 75 lik etanolden 500 µl eklendi. Tüpler 8.000 g’de 3 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı ve pellet kurumaya bırakıldı. Kuruyan pellet üzerine 30 µl DNaz /RNaz içermeyen su ilave edildi. Elde edilen RNA’ların miktar ve saflığının belirlenmesinde Epoch mikropilaka spektrofotometre kullanıldı. Çözülmüş RNA örneğinden 2 µl alınıp, 0,2ml’lik steril eppendorf tüp içinde son hacim 4 µl olacak şekilde DNaz/RNaz içermeyen su ile tamamlandı. Spektrofotometrede OD260 ve OD280 değerleri ölçüldü. OD260 ve OD280 değerlerinin oranı hesaplanarak RNA’nın saflığı belirlendi. Elde edilen RNA örnekleri -80 °C’de saklandı.

### 3.2.7. DNaz Muamelesi ve cDNA Sentezi

#### 3.2.7.1. DNaz Muamelesi

Elde edilen RNA örneklerinden DNaz muamelesi Thermo Scientific™ DNase I, RNase-free kiti ile firma talimatlarına uyularak gerçekleştirilmiştir. DNaz kiti prosedürü **Tablo 3.1.**'de açıklanmıştır.

**Tablo 3.1.** DNaz Muamelesi

| Kit bileşeni           | 10 µl reaksiyon hacmi için |
|------------------------|----------------------------|
| 10X React Buffer       | 1 µl                       |
| DNaseI, RNase-free     | 1 µl                       |
| 1 µg RNA               | ***                        |
| DNase/RNase free water | 10 µl'ye tamamlanır.       |

**Tablo 3.1.**'deki direktiflere göre hazırlanan reaksiyon tüpleri **Tablo 3.2.**'deki PCR koşullarına bırakılır.

**Tablo 3.2.** DNaz PCR koşulları

| Adımlar | Sıcaklık (°C) | Zaman (dakika) |
|---------|---------------|----------------|
| 1. Adım | 37            | 30 dakika      |
| 2. Adım | 65            | 10 dakika      |

#### 3.2.7.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezi BioRad iScript cDNA sentez kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon bileşenleri Tablo 3.3.'te verildiği şekilde hazırlanarak Tablo 3.4.'te verilen PCR koşullarına bırakılmıştır.

**Tablo 3.3.** BioRad iScript cDNA sentez kiti bileşenleri

| cDNA PCR mix bileşenleri (µl) 1 örnek için |            |
|--------------------------------------------|------------|
| Reaktif                                    | Hacmi (µl) |
| 10X RT Buffer                              | 2          |
| 25X dNTP mix                               | 0,8        |
| Nuclease-free Water                        | 4,2        |
| Toplam reaksiyon                           | 10         |

**Tablo 3.4.** BioRad iScript PCR basamakları

| Adımlar | Sıcaklık | Zaman (dakika) |
|---------|----------|----------------|
| 1. Adım | 25 °C    | 5              |
| 2. Adım | 46 °C    | 20             |
| 3. Adım | 95 °C    | 1              |
| 4. Adım | 4 °C     | -              |

### 3.2.8. Eş-Zamanlı Kantitatif PCR (qPCR)

Kantitatif Eş-Zamanlı PCR (qPCR) reaksiyonları için NYX Teknik Light Cycler 480 -II (Roche) cihazı kullanıldı ve qPCR reaksiyonu üretici firma tarafından sağlanan İScript Reverse Transkripsiyon kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar -80 °C'de saklandı. İlgili genlerin RNA ifadelerinin tespitinde kullanılan primerlerin sekansları Tablo 3.5.'de verilmiştir.

**Tablo 3.5.** Bu çalışmada kullanılan primerlerin sekansları.

| İlgili Gen    |   | Primer dizisi            | Uzunluk (bp) | TM (°C) |
|---------------|---|--------------------------|--------------|---------|
| <b>ALOX15</b> | F | GCTGTGAAAGACGACCCAGA     | 20           | 65      |
|               | R | GCACCCAAGAGTACCAGTCC     | 20           |         |
| <b>GPX4</b>   | F | GGGCAGACCCGAAAATCC       | 18           | 60      |
|               | R | GTTTATTCCCACAAGGTAGCC    | 21           |         |
| <b>TP53</b>   | F | ATTTGCGTGTGGAGTATTTGG    | 21           | 60      |
|               | R | ATGTAGTTGTAGTGGATGGTGGTA | 24           |         |
| <b>PTGS2</b>  | F | TTCAAGGGATTTTGGAAACG     | 19           | 60      |
|               | R | CAGCATTGTAAGTTGGTGGGA    | 20           |         |
| <b>SAT1</b>   | F | TATTTTACCTATGACCCGTGGA   | 22           | 60      |
|               | R | GAAGTTGATGGATGGTTCATTC   | 22           |         |
| <b>TF</b>     | F | GTGAACCCAACAACAAGAGG     | 21           | 60      |
|               | R | CATCAAGGCACAGCAACTC      | 19           |         |
| <b>HPRT</b>   | F | TGACACTGGCAAAACAATGCA    | 21           | 60      |
|               | R | GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT    | 21           |         |

Kontrol hücreleri ve madde uygulanan gruplar arasındaki gen ifadesi farklılıklarını belirlemek için yapılan qPCR için Roche LightCycler-II 480 cihazı kullanıldı. Yukarıda açıklandığı şekilde elde edilen cDNA'lar SYBR Green qPCR Mastermix protokolüne uygun olarak 96 kuyucuklu plate'lerde spesifik primerler ile çoğaltıldı. Analizden elde edilen piklere ait Cq değerleri gen ifadelerinin belirlenmesinde kullanıldı. Değerler  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metodu kullanılarak hesaplandı. İnternal gen olarak Hipoksantin Guanin Fosforibozil Transferaz (HPRT) kullanıldı. Gen ifadelerinin belirlenmesinde Tablo 1.'de verilmiş olan 19-22 baz çifti uzunluğunda 7 adet primerin Forward ve Reverse primer karışımları hazırlandı.

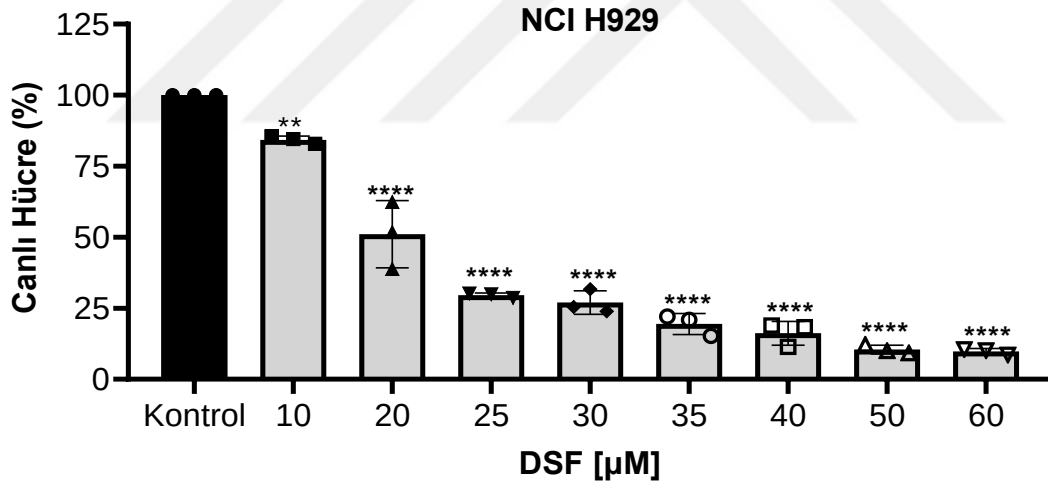
### 3.2.9. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi sırasında bir parametre açısından iki grup arasındaki anlamlı farkların belirlenmesinde bağımsız örneklem Student (unpaired) t-test ve bir parametre arasındaki anlamlı farkların belirlenmesinde One Way Anova-posthoc (Tukey) kullanılmıştır.  $p < 0.05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Tüm grafiklerde kullanılan hata çubukları standart sapma (SD)'yı göstermektedir.

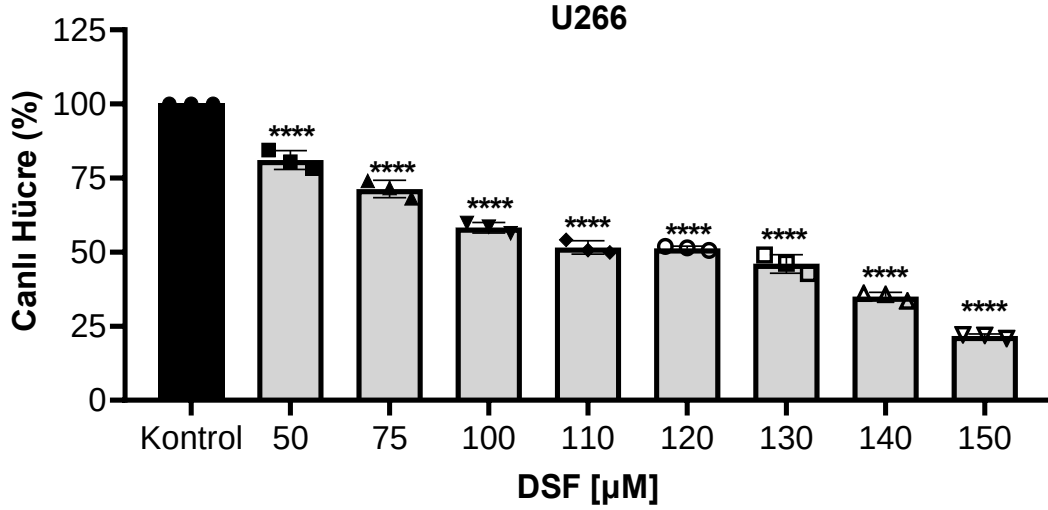
## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

### 4.1. DSF'in MM Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

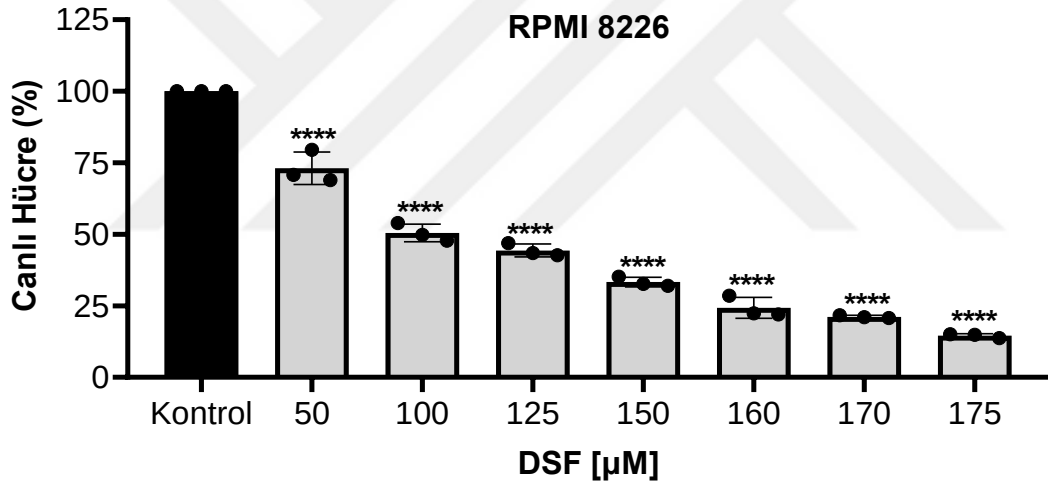
MM hücrelerinde DSF'in doza ve zamana bağlı sitotoksik etkisinin teyit edilmesi için, MM hücreleri DSF'in farklı dozları ile 48 saat süre zarfında muamele edildi ve sitotoksik etki MTT analiziyle değerlendirildi. Bu çalışmada ilk yapılan denemelerde hücrelere 24 saatlik inkübasyon süresince 0-1  $\mu\text{M}$  arasındaki dozlarda DSF uygulandı. Ancak, MTT analizi sonucunda 24 saatlik denemede DSF'in hücre canlılığı üzerine olan etkisinin sınırlı olduğu gözlemlendi. Dolayısıyla sonraki denemelerde 0-175  $\mu\text{M}$  arasında 8 veya 9 farklı doz uygulanarak 48 saatlik uygulama sonrası MTT analizi yapıldı. MTT sonuçları, kontrol grubu verileri baz alınarak yüzdelik üzerinden hesaplandı. 48 saatlik DSF muamelesinden sonra elde edilen sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücreleri için  $\text{IC}_{50}$  değerleri sırasıyla 29  $\mu\text{M}$ , 129  $\mu\text{M}$  ve 109  $\mu\text{M}$  olarak hesaplandı. MM hücrelerinde artan DSF konsantrasyonlarına karşı hücre canlılığının azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.1-4.3).



Şekil 4.1. DSF ile 48 saat muamele edilen NCI H929 hücrelerinde hücre canlılığı grafiği



Şekil 4.2. DSF ile 48 saat muamele edilen U266 hücrelerinde hücre canlılığı grafiği



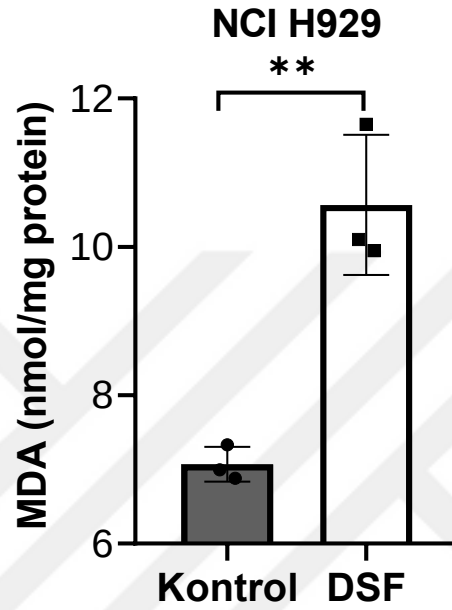
Şekil 4.3. DSF ile 48 saat muamele edilen RPMI 8226 hücrelerinde hücre canlılığı grafiği

## 4.2. MM Hücrelerinde DSF Muamelesinin Ferroptozis Üzerine Etkisi

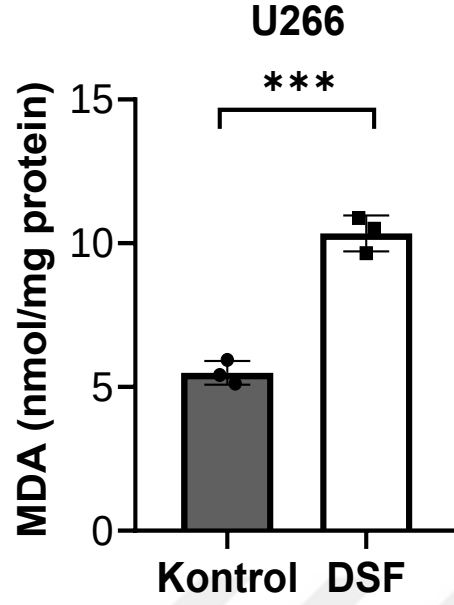
### 4.2.1. MM Hücrelerinde DSF'in Ferroptozis Belirteci Olan Lipit Peroksidasyonu Üzerine Etkisi

DSF ile 48 saat muamele edilen MM hücrelerinde hücre canlılığının azaldığı teyit edildikten sonra, DSF'in MM hücrelerinde ferroptozis ölüm yolağını uyarıp uyarmadığı araştırıldı. Hücre içi demir birikiminin neden olduğu lipit peroksidasyonu ferroptozisin en

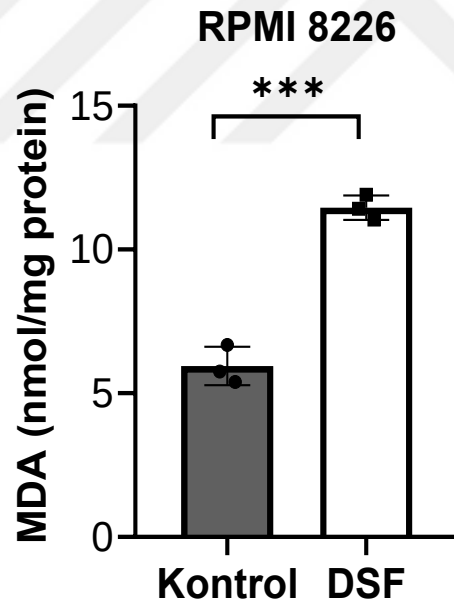
önemli özelliklerinden biridir. Bu nedenle, lipid peroksidasyonunun son ürünü malondialdehit (MDA) yıkım ürünlerinden biri olduğundan öncelikle DSF ile 48 saat muamele edilen MM hücrelerinde lipid peroksidasyon belirteci olarak kullanılan MDA miktarı tayin edildi (Şekil 4.4-4.6). Üç farklı zamanda MDA testi yapılarak elde edilen veriler, her üç MM hücre hattında kontrol grubuna kıyasla DSF uygulanan grupta lipid peroksidasyonunun önemli miktarda arttığını göstermektedir. (Şekil 4.4-4.6).



**Şekil 4.4.** NCI H929 hücrelerinde 48 saatlik DSF muamelesinin ardından MDA miktarındaki değişim



**Şekil 4.5.** U266 hücrelerinde 48 saatlik DSF muamelesinin ardından MDA miktarındaki değişim

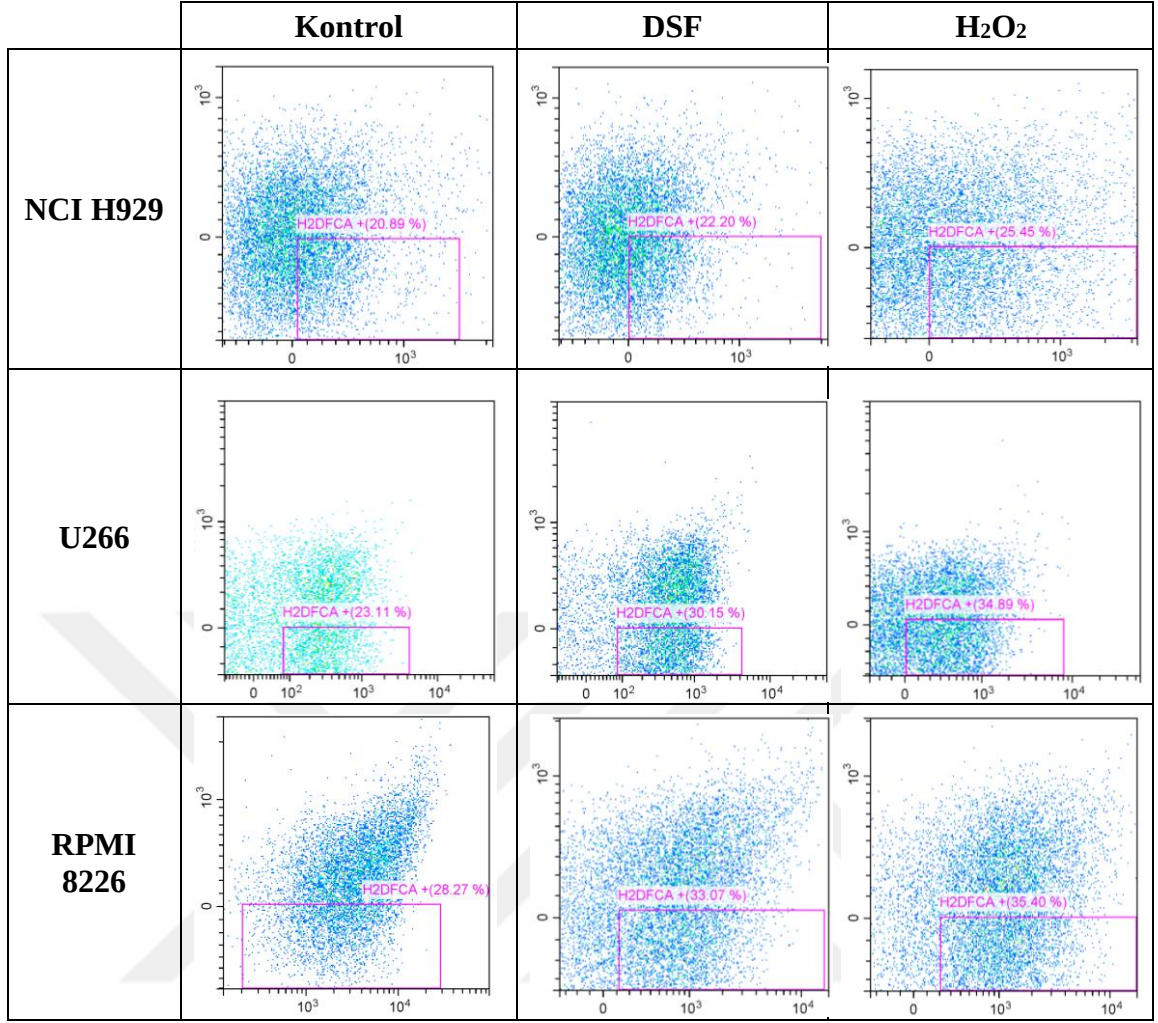


**Şekil 4.6.** RPMI 8226 hücrelerinde 48 saatlik DSF muamelesinin ardından MDA miktarındaki değişim

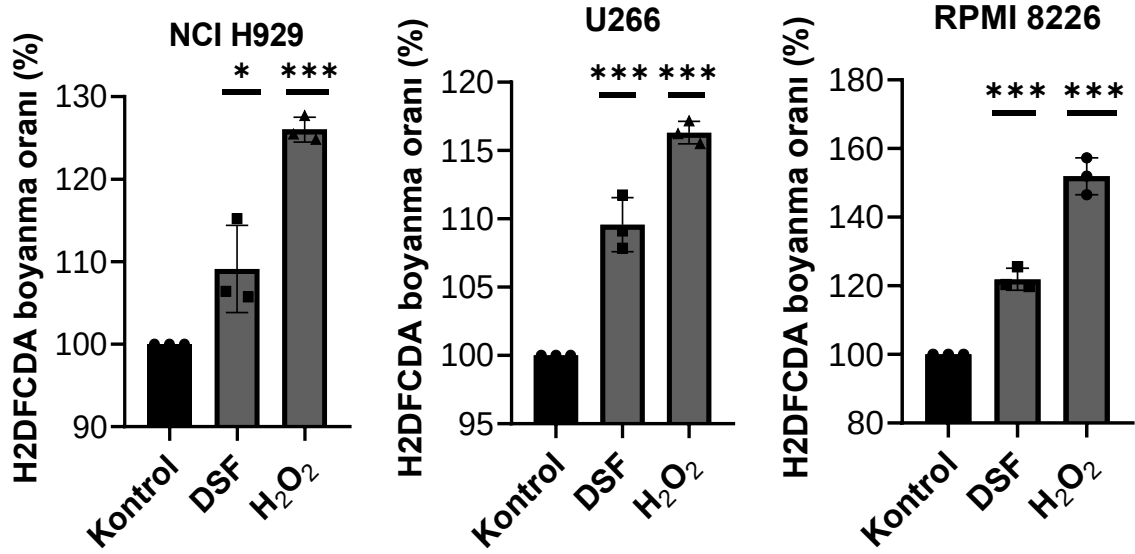


#### 4.2.2. MM Hücrelerinde DSF'ın Ferroptozisin Oluşmasında Rol Oynayan ROS Üzerine Etkisi

Özellikle, demire bağlı fenton reaksiyonu ile üretilen hücre içi ROS ferroptozisde ana ROS kaynağını oluşturmakta ve lipidlerin peroksidasyonuna neden olmaktadır. DSF'ın MM hücrelerinde sitozolik ROS üretiminin artışına neden olup olmadığının anlaşılması amacıyla, MM hücreleri DSF IC<sub>50</sub> değerleri ile 48 saat muamele edildikten sonra hücre içi sitozolik ROS miktarını tayin etmede kullanılan floresan işaretli bir boya olan H2DFCDA ile boyanmış ve akış sitometrisinde analiz edilmiştir. Kontrol grubuna DMSO eklenirken, pozitif kontrol grubuna %3 oranında hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) eklenmiştir (Şekil 4.7). Akış sitometrisi sonuçları değerlendirildiğinde, H2DFCDA boyamasının yapıldığı DSF ile muamele edilen MM hücrelerinde ROS miktarında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.8) (p<0.0001). Sonuç olarak, DSF uygulanmasının MM hücrelerinde hücre içi ROS miktarını arttırdığı anlaşılmaktadır.



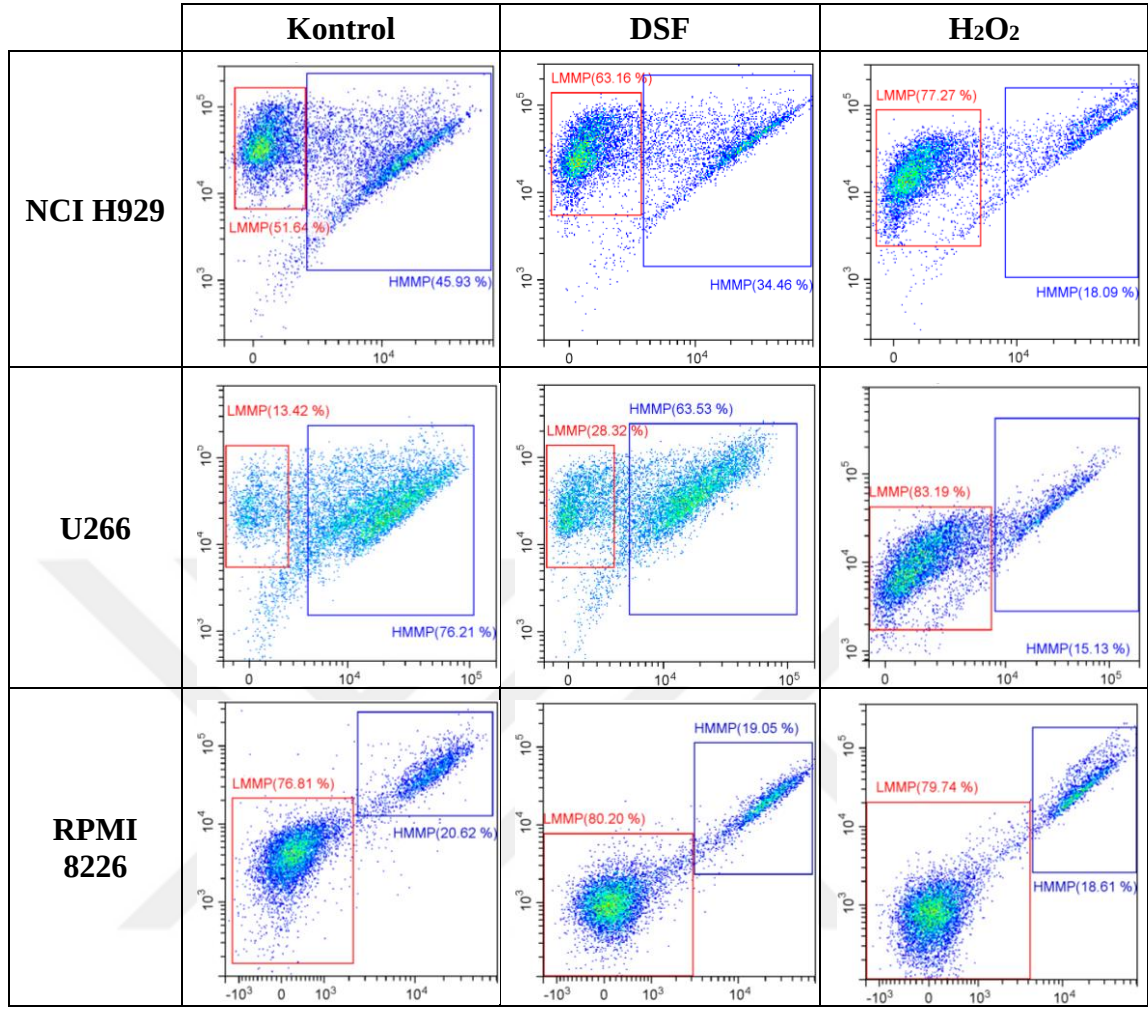
**Şekil 4.7.** Kontrol (DMSO), DSF ve pozitif kontrol olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%3) ile 48 saat muamele edilen NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücrelerinin hücre içi ROS miktarını gösteren H2DFCDA floresan boyamasının temsili akış sitometri görüntüleri



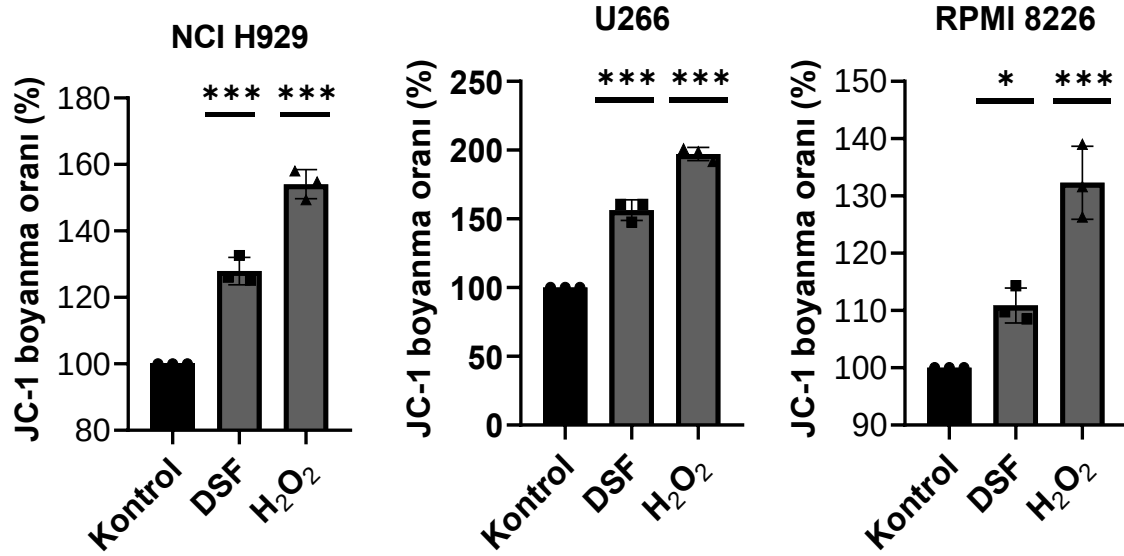
**Şekil 4.8.** Kontrol (DMSO), DSF ve pozitif kontrol olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%3) ile 48 saat muamele edilen NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde H2DFCDA floresan boyasının kantitasyonunu gösteren grafikler

#### 4.2.3. MM Hücrelerinde DSF'in Mitokondriyal Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi

Mitokondriyal membran potansiyeli olan  $\Delta\Psi_m$ , mitokondriyal fonksiyonun önemli bir parametresidir ve hücre sağlığının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Katyonik JC-1 boyası, sağlıklı hücrelere uygulandığında, ağırlıklı olarak mitokondride lokalize olduğu bilinmekte ve mitokondriyal  $\Delta\Psi$  değerlendirmesi için güvenilir bir floresan probu temsil etmektedir (Elefantova vd., 2018). MM hücreleri DSF IC<sub>50</sub> değerleri ile 48 saat muamele edildikten sonra katyonik JC-1 floresan boyası ile boyanmış ve akış sitometrisinde ölçümleri yapılmıştır. Kontrol grubuna DMSO eklenirken, pozitif kontrol grubuna %3 oranında hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) eklenmiştir.  $\Delta\Psi_m$ 'nin değişimi JC-1 kullanılarak incelenmiştir. Yüksek  $\Delta\Psi_m$ 'ye sahip sağlıklı hücrelerde JC-1, J-agregatları olarak bilinen kompleksler oluşturur. Düşük  $\Delta\Psi_m$ 'ye sahip hücrelerde mitokondriyal hasar oluşur ve bu durumda, JC-1 monomer formda kalır. 510 nm'de uyarıldığında, JC-1 monomerleri maksimum ~527 nm'de yeşil bir floresan yayar. JC-1 agregatları, maksimum ~590 nm'de turuncu-kırmızı bir flüoresan yayar. JC-1 boyası ile boyanmış hücrelerin  $\Delta\Psi_m$  kaybı, yeşil floresanda artış ile gösterilmektedir. JC-1 boyamasının sonucunda akış sitometrisi sonuçları değerlendirilmiş (Şekil 4.9) ve DSF ile muamele edilen hücrelerde mitokondriyal membran potansiyelinin arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.10) ( $p < 0.0001$ ). Elde edilen veriler, MM hücrelerinde DSF'in mitokondriyal membran potansiyelini depolarize ettiğini göstermektedir.



**Şekil 4.9.** Kontrol (DMSO), DSF ve pozitif kontrol olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%3) ile 48 saat muamele edilen NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücrelerinin  $\Delta\Psi_m$  indikatörü JC-1 floresan boyamasının temsili akış sitometri görüntüleri



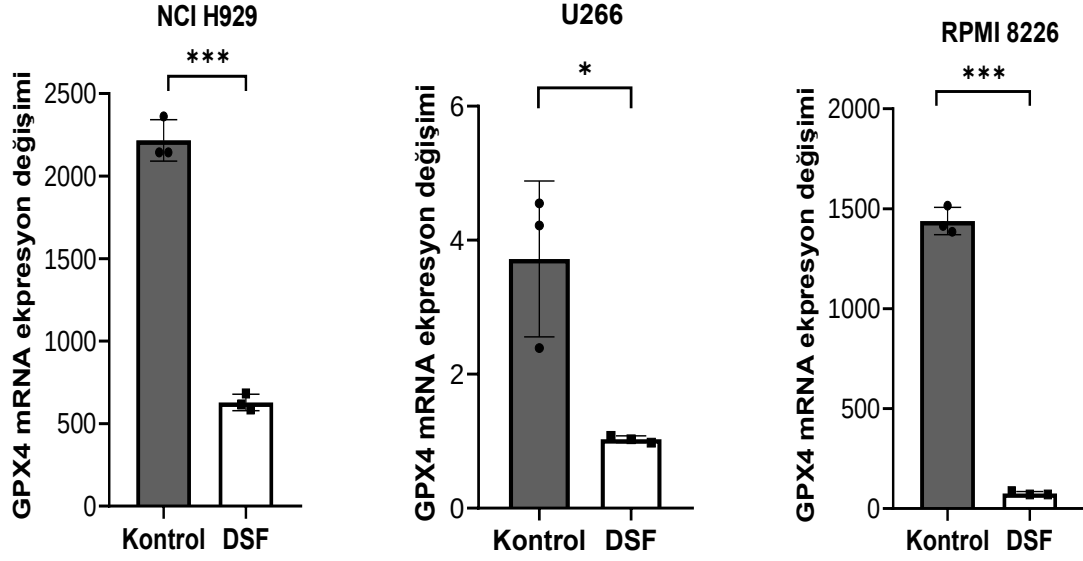
**Şekil 4.10.** Kontrol (DMSO), DSF ve pozitif kontrol olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%3) ile 48 saat muamele edilen NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücrelerinin JC-1 floresan boyanma yüzdeleri

#### 4.2.4. MM Hücrelerinde DSF'in Ferroptotik Genlerin mRNA Ekspresyonları Üzerine Etkisi

MM hücrelerinde DSF uygulamasının ferroptozis sinyal yolağında rol oynayan bazı hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi test edildi. MM hücreleri, DSF IC<sub>50</sub> dozlarıyla 48 saat muamele edildikten sonra hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra cDNA'lar sentezlenerek kontrol ve DSF uygulanan gruplarda gerçek zamanlı PCR yöntemi ile hedef genlerin ekspresyon düzeyleri belirlendi. Uygulama dozları NCI H929, RPMI 8226 ve U266 hücreleri için sırasıyla 29 µM, 109 µM ve 129 µM şeklinde olup, kontrol grubuna ise %0,5 olacak şekilde DMSO uygulandı.

##### 4.2.4.1. GPX4 mRNA ekspresyon değişimi

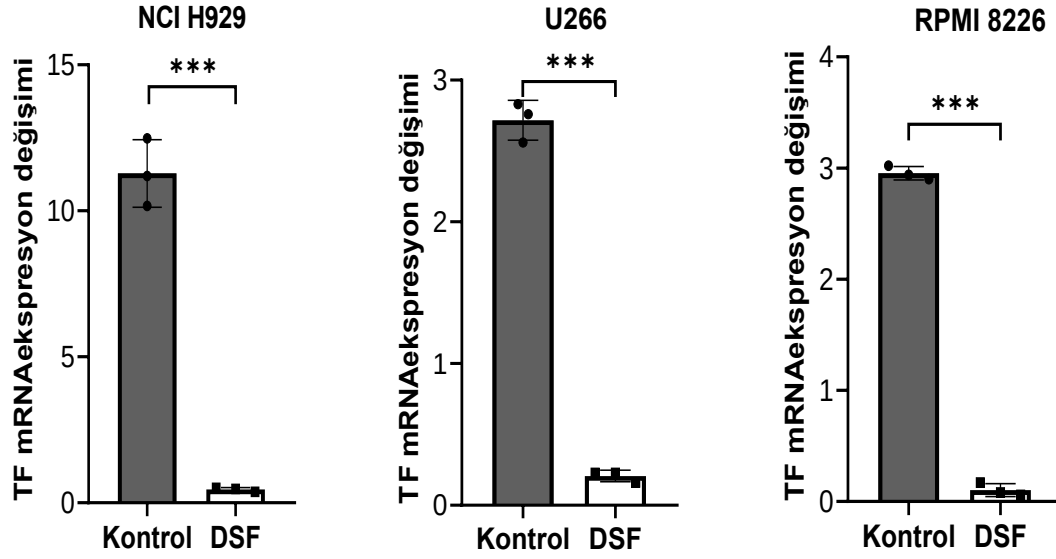
GPX4'ün inaktivasyonu, ROS üretimine, hücre içi peroksitlerin birikmesine ve ferroptozisin tetiklenmesine neden olduğundan, MM hücrelerinde DSF uygulamasının GPX4 geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi araştırıldı. Kontrol hücrelere kıyasla, 48 saat DSF uygulanan NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde GPX4 mRNA ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0.0162-0.0001$ ) (Şekil 4.11).



**Şekil 4.11.** NCI H929 U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde 48 saatlik DSF muamelesinin ardından GPX4 mRNA ekspresyon değışimi

#### 4.2.4.2. TF mRNA ekspresyon değışimi

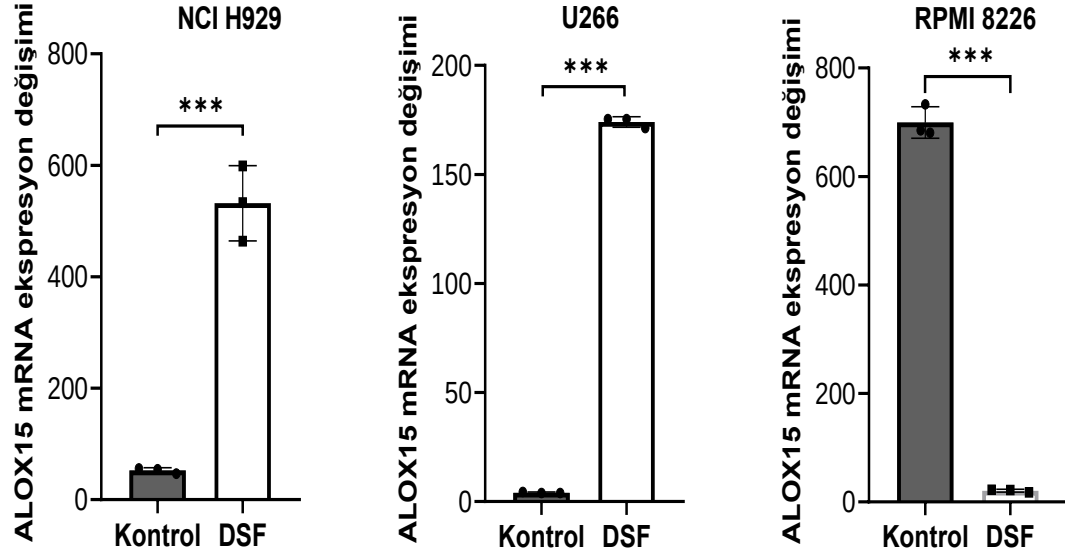
GPX4 mRNA ekspresyon seviyesindeki azalma MM hücrelerinde ferroptozisin uyarıldığını göstermektedir. Bu durumda hücre içine demir alınımı ile ilişkili olan transferrin proteinini kodlayan transferrin (TF) genin mRNA ekspresyon düzeyi test edildi. Kontrol hücrelere karşılaştırıldığında 48 saat DSF uygulanan NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde TF mRNA ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı azalış gözlemlendi ( $p < 0.0001$ ) (Şekil 4.12).



**Şekil 4.12.** NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde 48 saatlik DSF muamelesinin ardından TF mRNA ekspresyon değışimi

#### 4.2.4.3. ALOX15 mRNA Ekspresyon Değışimi

PUFA-fosfolipitlerde spesifik redoks reaksiyonlarını başlatabilen araşidonik asit 15-lipoksijenaz-1 (ALOX15)'in mRNA ekspresyon değışimi 48 saat süre boyunca DSF uygulanan MM hücrelerinde incelendiğinde, RPMI 8226 hücrelerinde ALOX15 mRNA ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı azalış, NCI H929 ve U266 hücrelerinde ise ALOX15 mRNA ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edildi ( $p < 0.0162-0.0001$ ) (Şekil 4.13).

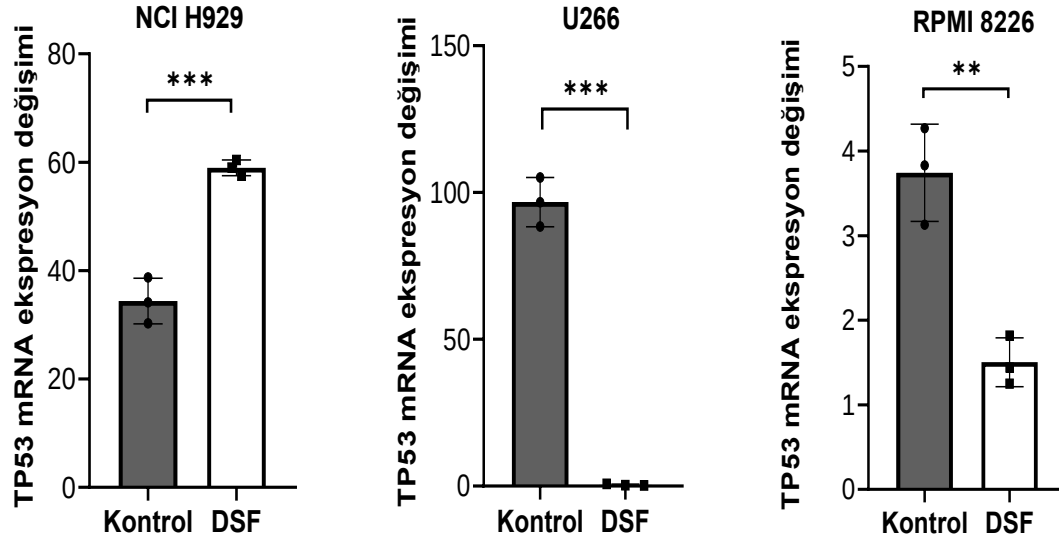


**Şekil 4.13.** NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde 48 saatlik DSF muamelesinin ardından ALOX15 mRNA ekspresyon değişimi.

#### 4.2.4.4. TP53 mRNA Ekspresyon Değişimi

Ferroptosis ölüm yolağında önemli rollere sahip tümör baskılayıcı TP53 mRNA seviyesinin DSF uygulamasından etkilenip etkilenmediği TP53 yabancıl tip (+/+) NCI H929, TP53 mutant (+/-) U266 ve TP53 delete (-/-) RPMI 8226 hücrelerinde araştırıldı. DSF ile 48 saat muamele edilen U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde TP53 mRNA ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı azalış, NCI H929 hücrelerinde TP53 proteinini kodlayan genin ekspresyon düzeyinde ise istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi ( $p < 0.0162-0.0001$ ) (Şekil 4.14).

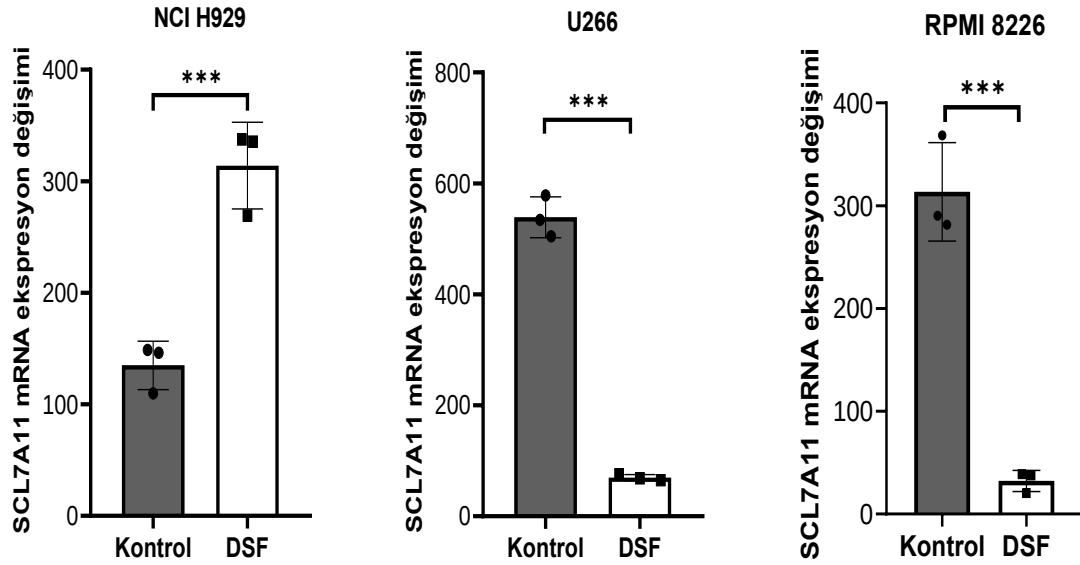




**Şekil 4.14.** NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde 48 saatlik DSF muamelesinin ardından TP53 mRNA ekspresyon değişimi.

#### 4.2.4.5. SLC7A11 mRNA Ekspresyon Değişimi

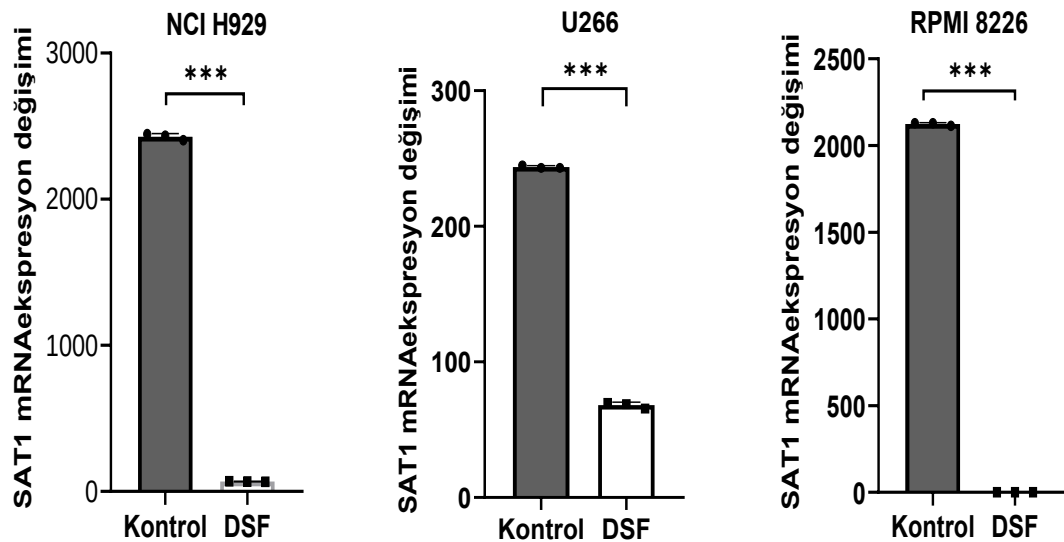
*Sistem-Xc*'nin bileşenlerinden biri olan çözünen taşıyıcı aile 7 üyesi 11 (SLC7A11), ferroptozisde sistin metabolizmasının ve redoks dengesinin düzenlenmesinde rol oynadığından, MM hücrelerinde DSF uygulamasının SLC7A11 mRNA ekspresyonu üzerine etkisi araştırıldı. Kontrol hücelere kıyasla, 48 saat DSF uygulanan NCI H929 hücrelerinde SLC7A11 mRNA ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlenirken, U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde ise SLC7A11 mRNA ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı azalış belirlendi ( $p < 0.0162-0.0001$ ) (Şekil 4.15).



**Şekil 4.15.** NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde 48 saatlik DSF muamelesinin ardından SLC7A11 mRNA ekspresyon değışimi

#### 4.2.4.6. SAT1 mRNA Ekspresyon Değışimi

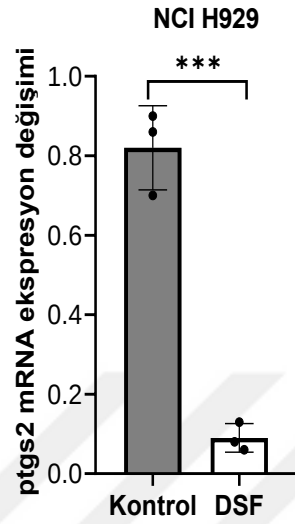
TP53'ün transkripsiyonel hedefi olan SAT1'in aktivasyonu lipid peroksidasyonuna neden olmasından dolayı, DSF uygulamasından sonra NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde SAT1 mRNA ekspresyon düzeyi araştırıldı ve DSF uygulanan her üç MM hücre hatında kontrol hücelere kıyasla SAT1 mRNA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı azalış bulundu ( $p < 0.0162-0.0001$ ) (Şekil 4.16).



**Şekil 4.16.** NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde 48 saatlik DSF muamelesinin ardından SAT1 mRNA ekspresyon değışimi

#### 4.2.4.7. ptgs2 mRNA Ekspresyon Değişimi

DSF uygulamasından sonra NCI H929 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre ptgs2 mRNA ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı azalış gözlemlendi. U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde ise ptgs2 ifadesine rastlanmamıştır (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. NCI H929 hücrelerinde 48 saatlik DSF muamelesinin ardından ptgs2 mRNA ekspresyon değışimi

## 4.2. TARTIŞMA

Yapılan bu tez çalışmasında, alkolizm tedavisinde kullanılan ve ayrıca farklı kanser çeşitlerinde in vitro ve in vivo antikanser etkinliği bilinen disülfiram (DSF)'in multipl miyelom (MM) hücrelerinde ferroptozis ölüm yolağı üzerine etkisi araştırılmıştır. DSF ile 48 saat süren muamele sonrasında NCI H929, U266 ve RPMI 8226 MM hücre hatlarında lipit peroksidasyonu düzeyini araştırmak için MDA analizi yapılmıştır. MDA analizi sonuçları, DSF'in MM hücrelerinde lipit peroksidasyonunu arttırdığını ortaya koymuştur. Ferroptozisin temel özelliklerinden olan hücre içi ROS miktarının artması ve mitokondriyal hasarın oluşmasını test etmek adına DSF ile muamele edilen MM hücreleri sırasıyla H2DFCA ve JC-1 floresan boya ile boyanmış ve bu boyaların akış sitometrisinde analizleri yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre DSF, MM hücrelerinde ROS miktarını yükseltmiş ve mitokondriyal membran depolarizasyonunu arttırmıştır. Ferroptozis ile ilişkili genlerden GPX4, TF, ALOX15, SAT1, TP53, ptgs2 ve SLC7A11 gen ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler qPCR kullanılarak araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlardan DSF'in NCI H929, U266 ve RPMI 8226 MM hücre hatlarında ferroptozisi tetikleyerek hücre ölümüne neden olduğu tespit edilmiştir. İlave olarak, ferroptozisi yönlendiren TP53 ve Nrf2 gibi transkripsiyonel faktörlerin ise DSF'in etki mekanizmasını farklı şekilde yönlendirebileceği qPCR sonuçlarından anlaşılmaktadır.

MM, lenfomadan sonra en yaygın ikinci hematolojik malignite olup, UPR ve ER streslerini uyaran ve fonksiyonel olmayan Ig üretimi ile karakterize edilmektedir (Breznik vd., 2017). MM hastalarının ortalama sağ kalım sürelerinin uzamasında etkili olan son dönem çeşitli tedavi seçeneklerine rağmen, hastaların çoğunun değişken bir tedavi süresinden sonra kaçınılmaz olarak relaps ve mevcut tedavilere dirençli hale gelmesinden (refrakter) dolayı MM hâlâ öldürücü maligniteler arasında yer almaktadır (Besse vd., 2018). MM'da proteazom inhibisyonu, hücre içi proteinlerin birikip hücrenin ölümüne sebep olmasından dolayı ilk nesil proteazom inhibitörü olan bortezomib, MM hastalarının sağ kalım sürelerini iyileştirmede devrim yaratmıştır. İkinci nesil carfilzomib ve üçüncü nesil ixazomib, klinikte bortezomib dirençli hastalarda oluşan direncin üstesinden gelerek ölüm riskinde önemli bir azalma sağlamıştır (Robak vd., 2018). Bununla birlikte, carfilzomib ve ixazomib proteazom inhibitörlerine karşı gelişen ilaç direnci, şu anda MM'da terapötik başarıyı sınırlandırmaktadır (Besse vd., 2018). Bu nedenle, MM tedavisinde bu hastalığın patogenezi yönlendiren farklı moleküler yolları hedefleyen yeni kemoterapötik ajanların uygulanmasına ihtiyaç vardır.

Umut vaat eden anti-kanser etki gösteren ilaçlar arasında alkol bağımlılığının tedavisinde 70 yıldan fazla süredir kullanılan DSF bulunmaktadır (Iljin vd., 2009). DSF, FDA'nın tavsiye ettiği dozda güvenli ve toleransa sahip bir ilaçtır (Cvek, 2012). Ditiocarb, insan vücudundaki etki mekanizmasına katkıda bulunan ana DSF metabolitidir (Cvek 2012; Dufour vd., 1993). DSF'in bakır ile birlikte düşük konsantrasyonlarda (0.5-5  $\mu$ M) uygulanması MM dahil farklı kanser hücrelerinde sitotoksik etki yarattığı birçok çalışma ile gösterilmiştir (Salem vd., 2015; Drozdokova ve Trtkova, 2021; Du vd., 2022). DSF ve bakırın birlikte uygulanmasının proteozom ve nükleer faktör-KB aktivitelerini kronik lenfosit lösemi hücrelerinde (Lövborg vd., 2006), MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonlarını inhibe ederek insan osteosarkoma hücrelerinde invazyonun engellenmesine (Cho vd., 2007), glioblastomada hücre içi ROS miktarını arttırarak ferroptozisi uyardığı ve Polo benzeri kinaz-1 ifadesini baskıladığı (Qiu vd., 2020) bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında, NCI H929, U266 ve RPMI 8226 MM hücre hatlarında DSF'in IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 29  $\mu$ M, 129  $\mu$ M ve 109  $\mu$ M olarak belirlenmiştir. Literatür taramalarında ise DSF IC<sub>50</sub> değerleri 0.5-5  $\mu$ M arasında değişmekte olduğu, bu konsantrasyon farkının ise ilacın temin edildiği firma ve laboratuvar tekniklerinde oluşabilen farklılıklardan kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda DSF ve bakır kombinasyonu yerine yalnızca DSF uygulanmasının sebebi, bakırın insan vücudundaki endojen biyolojik dağılımı ve ekzojen bakır kaynaklı bakır toksisitesinin DSF'in in vivo uygulamasını ciddi şekilde engellediğinin (Wu vd., 2019) bildirilmesinden kaynaklanmaktadır.

Ferroptoziste hücre içinde bulunan kararsız Fe<sup>+2</sup> iyonları H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile fenton reaksiyonuna girerek lipidler için oldukça tehlikeli olan ROS türevlerinin üretilmesine sebep olmaktadır. Hücre içi artan ROS miktarı hem hücre bütünlüğüne hem de hücre içi organel membranlarının hasar görmesine neden olmakta ve böylece ferroptozisi uyarmaktadır (Park ve Chung, 2019). Yapılan bu çalışmada, hücre içi ROS miktarını gösteren H2DFCDA floresan boyası akış sitometrisinde analiz edilmiş ve MM hücre hatlarında DSF uygulamasının hücre içi ROS miktrında artışa sebep olduğu bulunmuştur. Çalışmamıza paralel olarak DSF uygulamasının pankreas kanseri (Yip vd., 2011), glioblastoma (Qiu vd., 2020) ve osteosarkoma (Ren vd., 2021) hücrelerinde ROS miktarını arttırdığı gösterilmiştir.

Artan ROS çoklu doymamış yağ asitlerini hedefleyerek lipidlerin peroksidasyonuna neden olmaktadır. Ferroptozisin bir başka belirteci lipid peroksidasyonunun artmasıdır (Dodson 2019; Shui vd., 2021). DSF/Cu uygulamasının hepatoselüler karsinom ve akciğer kanseri hücrelerinde lipid peroksidasyonunu arttırdığı gözlenmiştir (Falls-Hubert vd., 2020; Ren vd., 2021). Yapılan bu çalışmada, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA miktarı

analiz edilmiş ve MDA sonuçlarına göre DSF uygulamasının MM hücrelerinde lipid peroksidasyonunu arttırdığı gözlemlenmiştir.

Ferroptoziste mitokondri oldukça etkin bir rol oynamaktadır. Akış sitometrisi analizinde mitokondriyal hasarı gösteren katyonik bir floresan boya olan JC-1 boyası ile mitokondriyal membran yoğunluğu DSF ile muamele edilen MM hücrelerinde incelenmiş ve DSF uygulamasının mitokondriyal membran depolarizasyonuna sebep olduğu bulunmuştur. Artmış mitokondriyal membran yoğunluğu hücrelerde mitokondriyal hasarın arttığını doğrulamaktadır (Falls-Hubert vd., 2020).

DSF'in MM hücrelerinde ferroptozis hücre ölüm yolağını aktifleştirdiği gözlemlenmiştir. Özellikle, ferroptozis hücre ölüm yolağıyla ilgili olarak GPX4 ve SCL7A11 genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerinde azalmaya yol açtığı bulunmuştur. Demir metabolizmasıyla ilgili olarak ise DSF, TF geninin mRNA ekspresyon seviyesinde önemli azalışa yol açmıştır. Ayrıca ferroptozisin TP53 aracılı gerçekleştiği ve bu yolun SAT1 geniyle ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda bulunmuştur (Mou vd., 2022). TP53 (+/-) U266 ve TP53 (-/-) RPMI 8226 hücre hatlarında DSF muamelesinin TP53 mRNA ekspresyon düzeyinin kontrol hücrelere kıyasla azalmasına sebep olurken TP53 (+/+) NCI H929 hücrelerinde ise TP53 mRNA ifadesinin artmasına sebep olmuştur. MM hücrelerinde DSF muamelesinin SAT1 gen ekspresyon düzeylerinin azalmasına neden olmuştur. Bu durum NCI H929 yabancı tip TP53 taşıırken U266 ve RPMI 8226 hücrelerinin TP53 proteinin ifadesinin olmamasıyla ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

Glutasyon (GSH) biyosentezi ve glutasyon peroksidaz 4'ün (GPX4) düzgün çalışması, ferroptozisi kontrol altında tutmaktadır. GPX4 inhibisyonu ile sonuçlanan koşullar ferroptotik hücre ölümünü hassaslaştırmakta ve tetiklemektedir (Seibt vd., 2019). GPX4, potansiyel olarak toksik lipid hidroperoksitleri (L-OOH) toksik olmayan lipid alkollere (L-OH) dönüştürür. GSH'nin erastin ile veya doğrudan GPX4 inhibitörü ile baskılanması hücre ölümüne neden olan aşırı lipid peroksidasyonu ile sonuçlanmaktadır (Stockwell vd., 2017). Yapılan çalışmada DSF uygulaması sonrası MM hücre hatlarında GPX4 ekspresyon düzeyinde azalma görülmüştür. Bu durum DSF'nin ferroptozu indüklediğini göstermektedir.

Transferrin (TF), demirin hücre içine alınması için gereklidir ve hücre içi demir konsantrasyonuna yanıt olarak düzenlenir. Fibroblast hücreleri ile yapılan bir çalışmada erastin uygulamasından 6 saat sonra TF protein seviyelerinde artış gözlemlenmiştir (Park ve Chung, 2019). Hücre içi demir, hücre fonksiyonların yerine getirilmesinde oldukça önemlidir. Ancak, hücre içi demir birikimi, oksidatif fosforilasyonun yan ürünü olan hidrojen peroksit

ile demirin Fenton reaksiyonlarına girmesine ve lipidler için oldukça tehlikeli olan peroksidlerin oluşmasına neden olmaktadır. Yapılan bu çalışmada, MM hücrelerinde 48 saatlik DSF uygulamasının TF mRNA ekspresyon düzeyini azalttığı saptanmıştır. Bu durum DSF'in ferroptozisi erken aşamalarda uyardığı düşünülmektedir.

*Sistem Xc-*, bir hafif zincir alt birimi olan SLC7A11 ve bir ağır zincir alt birimi olan SLC3A2'den oluşmakta ve hücre dışı sistein ve hücre içi glutamat alışverişine aracılık etmektedir. Böylece, hücreleri oksidatif strese bağlı hasardan koruyan hücre içi glutatyonun (GSH) sentezini desteklediğinden SLC7A11 hücre içi antioksidan dengenin sağlanmasında görevlidir. Hücrelerin oksidatif stresten korunması için hücre içi glutamatı hücre dışı sisteinle takas eder. Sistein hücre içinde bir dizi biyolojik süreç sonunda glutatyona (GSH) dönüştürülür. Glutasyon oksitlenmiş lipidleri indirgeyerek lipid peroksidasyonunu engeller (Bian vd., 2023). Lipitlerin indirgenmesi sonucu glutasyon yükseltgenerek oksitlenmiş glutatyona dönüşür. Oksitlenmiş glutasyon GPX4 aracılığıyla indirgenerek tekrar glutasyon formuna dönüşür. SCL7A11 ifadesinin baskılanması ya da hedef ajanlarla inhibe edilmesi hücre içine sistein alımını sınırlar. Bunun sonucunda hücre içinde GSH tükenmesine sebep olur. GSH tükenmesi lipidlerin oksitlenmesi sonucu lipid peroksidasyonuyla sonuçlanır. Yapılan çalışmada DSF uygulamasının sonrasında SCL7A11 ekspresyon düzeylerinde azalma gözlemlenmiştir. Dolayısıyla, DSF'in MM hücrelerinde antioksidan mekanizmasını engelleyerek hücrelerde ferroptozisi uyardığı öngörülmektedir.

Genomun koruyucusu olan p53, çeşitli stresler altında hücre bölünmesi ve hayatta kalmanın kontrolüne katılmakla kalmaz, aynı zamanda hücrelerde apoptozis, otofaji ve ferroptozis ölüm yollarını da düzenler (Mandal vd., 2015). SAT1 geni, p53'ün transkripsiyonel hedefidir. Önceki çalışmalar, AdSAT1 (anahtar poliamin katabolik enzim SAT1'i kodlayan bir adenovirüs) transdüksiyonu tarafından indüklenen poliamin tükenmesinin, mitokondriyal distorsiyonlar aracılı intrinsik yol ile apoptozisi tetiklediğini göstermiştir (Ou vd., 2016). Qu ve ark.'ı SAT1'in, p53 aracılı ferroptozisin düzenlenmesinde yer aldığını doğrulamıştır (Qu vd., 2016; Youssef ve Miller, 2020). Son zamanlarda yapılan araştırmalar, demir eksikliğinin farklı hücre tiplerinde SAT1 ekspresyonunu yukarı regüle ettiğini vurgulamıştır (Mou vd., 2022). Yapılan çalışmada DSF muamelesinin SAT1 gen ekspresyon düzeylerini azaltmıştır.

Siklooksijenaz olarak da bilinen prostaglandin-endoperoksit sentaz (ptgs2), prostaglandin biyosentezinde anahtar enzimdir ve hem dioksijenaz hem de peroksidaz olarak işlev görür. Ferroptozis belirteci olarak belirtilen ptgs2'nin (Gao vd., 2022) U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde ifadesi gözlenmezken NCI H929 hücresinde ifadesi bulunmuştur. NCI H929

hücresinde DSF muamelesiden sonra gen ekspresyon düzeyinde azalma olduğu gözlenmiştir. Bu durum ptgs2'nin NCI H929 hücresinde peroksidaz olarak görev aldığını düşündürmüştür. MM'da ptgs2'nin işlevini tam olarak anlamak için ileri çalışmaların yapılması daha doğru sonuçlar sağlayacaktır.





## 5. SONUÇ

Sonuç olarak bu tez çalışmasında,

1. NCI H929, U266 ve RPMI 8226 MM (MM) hücre hatlarında DSF (DSF)'ın farklı konsantrasyonlarda 48 saatlik süre zarfında sitotoksik etkisi MTT yöntemi ile teyit edilmiştir.
2. MM hücre hatlarında MTT sonuçlarına göre hesaplanan DSF'in IC<sub>50</sub> değerleri ile 48 saat muamele edilen NCI H929, U266 ve RPMI 8226 MM hücrelerinde kontrol hücrelere kıyasla lipid peroksidasyonunun arttığı malondealdehit (MDA) miktarının tayini ile gösterilmiştir.
3. Lipit peroksidasyonunun kaynağı olarak hücre içi ROS miktarı, H2DFCDA floresan boyasının akış sitometrisinde değerlendirilmesi ile araştırılmıştır. DSF ile muamele edilmeyen hücrelere kıyasla DSF ile muamele edilen NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde H2DFCDA floresansındaki artış DSF'in hücre içi ROS miktarını arttırdığını göstermektedir.
4. Ferroptosis ölüm yolağının ayırt edici özelliklerinden mitokondri membranının depolarizasyonu, DSF ile muamele edilen NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli belirteci olarak kullanılan katyonik floresan JC-1 boyasının akış sitometrisinde analizi ile belirlenmiştir. Kontrol hücrelerle karşılaştırıldığında DSF'in MM hücrelerinde mitokondri membranının depolarizasyonuna neden olduğu anlaşılmıştır.
5. Ferroptotik genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri DSF uygulanan ve uygulanmayan NCI H929, U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde qPCR kullanılarak araştırılmıştır.
6. TP53 ifadesi bulunmayan (-/-) RPMI 8226 hücrelerinde DSF uygulaması ferroptotik düzenleyicilerden GPX4, TF, ALOX15, TP53, SLC7A11 ve SAT1'in mRNA ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalışa neden olduğu gözlemlenmiştir. Ptg2'nin ise RPMI 8226 hücrelerinde ifade edilmediği tespit edilmiştir.
7. TP53 ifadesi mutant olan (+/-) U266 hücrelerinde DSF uygulaması ferroptotik düzenleyiciler olan GPX4, TF, TP53, SLC7A11 ve SAT1'in mRNA ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalışa neden olduğu, ancak ALOX15 mRNA ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğu gözlemlenmiştir. RPMI 8226 hücrelerinde benzer şekilde Ptg2'nin hücrelerinde U266 ifade edilmediği tespit edilmiştir.
8. TP53 yabanıl tip (+/+) NCI H929 hücrelerinde DSF uygulaması ferroptotik düzenleyicilerden GPX4, TF, TP53 ve ptg2'nin mRNA ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalışa, ALOX15 ve SAT1 mRNA ekspresyon düzeylerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğu gözlemlenmiştir.
9. Elde edilen tüm bu sonuçlar DSF'in MM hücre hatlarında ferroptozisi tetikleyerek hücre ölümüne neden olduğunu ve ferroptozisi yönlendiren TP53 ve Nrf2 gibi transkripsiyonel

faktörlerin ise DSF'in etki mekanizmasını farklı şekilde yönlendirdiği qPCR sonuçlarından anlaşılmaktadır.

10. Kanser tedavisinde yaygın olarak karşılaşılan en büyük engel kanser hücrelerinin kemoterapotiklere karşı direnç geliştirmesidir. Direncin üstesinden gelebilmek için kullanılan yüksek doz kemoterapi ajanları hastalarda hem önemli yan etkilere neden olmakta hem de hastaların sağlıklı hücrelerine zarar verebilmektedir. Bu nedenle yeni ve yan etkileri daha düşük olan antikanser ilaçlarının keşfine ihtiyaç duyulmaktadır. Düşük maliyetli, minimum yan etkileri ve farklı kanserlere karşı yüksek seçiciliği ve diğer ilaçlarla sinerjistik aktivite gösterebilme nedenleriyle, DSF, proteozom inhibitör dirençli MM hücrelerinde hücre içi ferroptozisi uyarak tedavide karşılaşılan bu problemi aşmada yüksek potansiyele sahip bir antikanser ilacı olarak kabul edilebileceği düşünülmektedir.



## KAYNAKLAR

- Abdi, J., Qiu, L. ve Chang, H. (2014). Micro-RNAs, New performers in multiple myeloma bone marrow microenvironment. *Biomarker Research*, 2(1), 10.
- Abraham, J., Salama, N. N. ve Azab, A. K. (2015). The role of P-glycoprotein in drug resistance in multiple myeloma. *Leukemia & Lymphoma*, 56(1), 26-33.
- Alim, I., Caulfield, J. T., Chen, Y., Swarup, V., Geschwind, D. H., Ivanova, E., Ratan, R. R. (2019). Selenium Drives a Transcriptional Adaptive Program to Block Ferroptosis and Treat Stroke. *Cell*, 177(5), 1262-1279.e25.
- Allocati, N., Masulli, M., di Ilio, C. ve de Laurenzi, V. (2015). Die for the community: an overview of programmed cell death in bacteria. *Cell Death & Disease*, 6(1), e1609-e1609.
- Anderton, B., Camarda, R., Balakrishnan, S., Balakrishnan, A., Kohnz, R. A., Lim, L., Goga, A. (2017). MYC -driven inhibition of the glutamate-cysteine ligase promotes glutathione depletion in liver cancer. *EMBO reports*, 18(4), 569-585.
- Arfani, C. el, de Veirman, K., Maes, K., de Bruyne, E. ve Menu, E. (2018). Molecular Sciences Metabolic Features of Multiple Myeloma.
- Ayala, A., Muñoz, M. F. ve Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1-31.
- Bebber, C. M., Müller, F., Prieto Clemente, L., Weber, J. ve von Karstedt, S. (2020). Ferroptosis in Cancer Cell Biology. *Cancers*, 12(1), 164.
- Berghe, T. vanden, Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H. ve Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(2), 135-147.
- Bergsbaken, T., Fink, S. L. ve Cookson, B. T. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature Reviews Microbiology*, 7(2), 99-109.
- Besse, A., Stolze, S. C., Rasche, L., Weinhold, N., Morgan, G. J., Kraus, M., Driessen, C. (2018). Carfilzomib resistance due to ABCB1/MDR1 overexpression is overcome by nelfinavir and lopinavir in multiple myeloma. *Leukemia*, 32(2), 391-401.
- Bian, Z., Sun, X., Liu, L., Qin, Y., Zhang, Q., Liu, H., Sun, S. (2023). Sodium Butyrate Induces CRC Cell Ferroptosis via the CD44/SLC7A11 Pathway and Exhibits a Synergistic Therapeutic Effect with Erastin. *Cancers*, 15(2), 423.

- Bianchi, G., Richardson, P. G. ve Anderson, K. C. (2015). Perspectives Promising therapies in multiple myeloma.
- Bradley, J. M., le Brun, N. E. ve Moore, G. R. (2016). Ferritins: furnishing proteins with iron. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 21(1), 13-28.
- Breznik, B., Motaln, H. ve Lah Turnšek, T. (2017). Proteases and cytokines as mediators of interactions between cancer and stromal cells in tumours. *Biological Chemistry*, 398(7), 709-719.
- Brigelius-Flohé, R. ve Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- General Subjects*, 1830(5), 3289-3303.
- Buda, G., Ricci, D., Huang, C. C., Favis, R., Cohen, N., Zhuang, S. H., Orlowski, R. Z. (2010). Polymorphisms in the multiple drug resistance protein 1 and in P-glycoprotein 1 are associated with time to event outcomes in patients with advanced multiple myeloma treated with bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin. *Annals of Hematology*, 89(11), 1133-1140.
- Chaudhary, P. M. ve Roninson, I. B. (1993). Induction of Multidrug Resistance in Human Cells by Transient Exposure to Different Chemotherapeutic Drugs. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 85(8), 632-639.
- Chauhan, D. ve Anderson, K. C. (2003). Mechanisms of cell death and survival in multiple myeloma (MM): Therapeutic implications. *APOPTOSIS*, 8(4), 337-343.
- Chen, D., Cui, Q. C., Yang, H. ve Dou, Q. P. (2006). Disulfiram, a Clinically Used Anti-Alcoholism Drug and Copper-Binding Agent, Induces Apoptotic Cell Death in Breast Cancer Cultures and Xenografts via Inhibition of the Proteasome Activity. *Cancer Research*, 66(21), 10425-10433.
- Chen, X. ve Rotenberg, S. A. (2010). PhosphoMARCKS drives motility of mouse melanoma cells. *Cellular Signalling*, 22(7), 1097-1103.
- Cheng, Z. ve Li, Y. (2007). What Is Responsible for the Initiating Chemistry of Iron-Mediated Lipid Peroxidation: An Update. *Chemical Reviews*, 107(3), 748-766.
- Chi, P., Allis, C. D. ve Wang, G. G. (2010). Covalent histone modifications — miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nature Reviews Cancer*, 10(7), 457-469.
- Cho, H. J., Mei, A., Fukui, J., Tung, K., Leshchenko, V. v, Lagana, A., Parekh, S. (2016). MAGE-a Mediate Resistance to Chemotherapy in Multiple Myeloma through Regulation of Bcl-2 Proteins. *Blood*, 128(22), 3277-3277.

- Cho, H.-J., Lee, T.-S., Park, J.-B., Park, K.-K., Choe, J.-Y., Sin, D.-I., Chang, Y.-C. (2007). Disulfiram Suppresses Invasive Ability of Osteosarcoma Cells Via the Inhibition of MMP-2 and MMP-9 Expression. *BMB Reports*, 40(6), 1069-1076.
- Christofferson, D. E. ve Yuan, J. (2010). Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(2), 263-268.
- Ciechanover, A. (2005). Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(1), 79-87.
- Conrad, M., Kagan, V. E., Bayir, H., Pagnussat, G. C., Head, B., Traber, M. G. ve Stockwell, B. R. (2018). Regulation of lipid peroxidation and ferroptosis in diverse species. *Genes & Development*, 32(9-10), 602-619.
- Conrad, M. ve Sato, H. (2012). The oxidative stress-inducible cystine/glutamate antiporter, system x c <sup>-</sup>: cystine supplier and beyond. *Amino Acids*, 42(1), 231-246.
- Cvek, B. (2012). Nonprofit drugs as the salvation of the world's healthcare systems: the case of Antabuse (disulfiram). *Drug Discovery Today*, 17(9-10), 409-412.
- Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell*, 149(5), 1060-1072.
- Dixon, S. J. ve Stockwell, B. R. (2014). The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nature Chemical Biology*, 10(1), 9-17.
- Dodson, M., Castro-Portuguez, R. ve Zhang, D. D. (2019). NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis. *Redox Biology*, 23, 101107.
- Dolma, S., Lessnick, S. L., Hahn, W. C. ve Stockwell, B. R. (2003). Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell*, 3(3), 285-296.
- Donehower, L. A., Soussi, T., Korkut, A., Liu, Y., Schultz, A., Cardenas, M., Wheeler, D. A. (2019). Integrated Analysis of TP53 Gene and Pathway Alterations in The Cancer Genome Atlas. *Cell Reports*, 28(5), 1370-1384.e5.
- Dowdle, W. E., Nyfeler, B., Nagel, J., Elling, R. A., Liu, S., Triantafellow, E., Murphy, L. O. (2014). Selective VPS34 inhibitor blocks autophagy and uncovers a role for NCOA4 in ferritin degradation and iron homeostasis in vivo. *Nature Cell Biology*, 16(11), 1069-1079.
- Dufour, P., Lang, J.-M., Giron, C., Duclos, B., Haehnel, P., Jaeck, D., Oberling, F. (1993). Sodium dithiocarb as adjuvant immunotherapy for high risk breast cancer: A randomized study. *Biotherapy*, 6(1), 9-12.

- Elefantova, K., Lakatos, B., Kubickova, J., Sulova, Z. ve Breier, A. (2018). Detection of the Mitochondrial Membrane Potential by the Cationic Dye JC-1 in L1210 Cells with Massive Overexpression of the Plasma Membrane ABCB1 Drug Transporter. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 1985.
- Falls-Hubert, K. C., Butler, A. L., Gui, K., Anderson, M., Li, M., Stolwijk, J. M., Spitz, D. R. (2020). Disulfiram causes selective hypoxic cancer cell toxicity and radio-chemosensitization via redox cycling of copper. *Free Radical Biology and Medicine*, 150, 1-11.
- Fang, X., Cai, Z., Wang, H., Han, D., Cheng, Q., Zhang, P., Wang, F. (2020). Loss of Cardiac Ferritin H Facilitates Cardiomyopathy via Slc7a11-Mediated Ferroptosis. *Circulation Research*, 127(4), 486-501.
- Feng, H. ve Stockwell, B. R. (2018). Unsolved mysteries: How does lipid peroxidation cause ferroptosis? *PLOS Biology*, 16(5), e2006203.
- Finlayson, A. E. ve Freeman, K. W. (2009). A Cell Motility Screen Reveals Role for MARCKS-Related Protein in Adherens Junction Formation and Tumorigenesis. *PLoS ONE*, 4(11), e7833.
- Franke, N. E., Niewerth, D., Assaraf, Y. G., van Meerloo, J., Vojtekova, K., van Zantwijk, C. H., Cloos, J. (2012). Impaired bortezomib binding to mutant  $\beta 5$  subunit of the proteasome is the underlying basis for bortezomib resistance in leukemia cells. *Leukemia*, 26(4), 757-768.
- Fuchs, Y. ve Steller, H. (2011). Programmed Cell Death in Animal Development and Disease. *Cell*, 147(4), 742-758.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486-541.
- Gao, F., Zhao, Y., Zhang, B., Xiao, C., Sun, Z., Gao, Y. ve Dou, X. (2022). Suppression of lncRNA *Gm47283* attenuates myocardial infarction via *miR-706* / *Ptgs2* /ferroptosis axis. *Bioengineered*, 13(4), 10786-10802.
- Gu, C., Jing, X., Holman, C., Sompallae, R., Zhan, F., Tricot, G., Janz, S. (2018). Upregulation of FOXM1 leads to diminished drug sensitivity in myeloma. *BMC Cancer*, 18(1), 1152.
- Guan, J., Lo, M., Dockery, P., Mahon, S., Karp, C. M., Buckley, A. R., Wang, Y.-Z. (2009). The x c – cystine/glutamate antiporter as a potential therapeutic target for small-cell

- lung cancer: use of sulfasalazine. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 64(3), 463-472.
- Haeggström, J. Z. ve Funk, C. D. (2011). Lipoxygenase and Leukotriene Pathways: Biochemistry, Biology, and Roles in Disease. *Chemical Reviews*, 111(10), 5866-5898.
- Hanamura, I. (2022). Multiple myeloma with high-risk cytogenetics and its treatment approach. *International Journal of Hematology*, 115(6), 762-777.
- Hassannia, B., Vandenabeele, P. ve vanden Berghe, T. (2019). Targeting Ferroptosis to Iron Out Cancer. *Cancer Cell*, 35(6), 830-849.
- Hatem, E., el Banna, N. ve Huang, M.-E. (2017). Multifaceted Roles of Glutathione and Glutathione-Based Systems in Carcinogenesis and Anticancer Drug Resistance. *Antioxidants & Redox Signaling*, 27(15), 1217-1234.
- Hideshima, T., Richardson, P., Chauhan, D., Palombella, V. J., Elliott, P. J., Adams, J. ve Anderson, K. C. (2001). The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer research*, 61(7), 3071-6.
- Huber, E. M., Heinemeyer, W. ve Groll, M. (2015). Bortezomib-Resistant Mutant Proteasomes: Structural and Biochemical Evaluation with Carfilzomib and ONX 0914. *Structure*, 23(2), 407-417.
- Iljin, K., Ketola, K., Vainio, P., Halonen, P., Kohonen, P., Fey, V., Kallioniemi, O. (2009). High-throughput cell-based screening of 4910 known drugs and drug-like small molecules identifies disulfiram as an inhibitor of prostate cancer cell growth. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(19), 6070-8.
- Imai, H. ve Nakagawa, Y. (2003). Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(2), 145-169.
- Ingold, I., Berndt, C., Schmitt, S., Doll, S., Poschmann, G., Buday, K., Conrad, M. (2018). Selenium Utilization by GPX4 Is Required to Prevent Hydroperoxide-Induced Ferroptosis. *Cell*, 172(3), 409-422.e21.
- Ishii, T., Sugita, Y. ve Bannai, S. (1987). Regulation of glutathione levels in mouse spleen lymphocytes by transport of cysteine. *Journal of Cellular Physiology*, 133(2), 330-336.
- Javadov, S. (2022). Mitochondria and ferroptosis. *Current Opinion in Physiology*, 25, 100483.

- Jiang, X., Stockwell, B. R. ve Conrad, M. (2021). Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(4), 266-282.
- Jin, N., Zhu, X., Cheng, F. ve Zhang, L. (2018). Disulfiram/copper targets stem cell-like ALDH<sup>+</sup> population of multiple myeloma by inhibition of ALDH1A1 and Hedgehog pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(8), 6882-6893.
- Kang, Y. P., Mockabee-Macias, A., Jiang, C., Falzone, A., Prieto-Farigua, N., Stone, E., DeNicola, G. M. (2021). Non-canonical Glutamate-Cysteine Ligase Activity Protects against Ferroptosis. *Cell Metabolism*, 33(1), 174-189.e7.
- Kannappan, V., Ali, M., Small, B., Rajendran, G., Elzhenni, S., Taj, H., Dou, Q. P. (2021). Recent Advances in Repurposing Disulfiram and Disulfiram Derivatives as Copper-Dependent Anticancer Agents. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8.
- Kastenhuber, E. R. ve Lowe, S. W. (2017). Putting p53 in Context. *Cell*, 170(6), 1062-1078.
- Kumar, S. K., Rajkumar, V., Kyle, R. A., van Duin, M., Sonneveld, P., Mateos, M.-V., Anderson, K. C. (2017). Multiple myeloma. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17046.
- Leung-Hagesteijn, C., Erdmann, N., Cheung, G., Keats, J. J., Stewart, A. K., Reece, D. E., Tiedemann, R. E. (2013). Xbp1s-Negative Tumor B Cells and Pre-Plasmablasts Mediate Therapeutic Proteasome Inhibitor Resistance in Multiple Myeloma. *Cancer Cell*, 24(3), 289-304.
- Li, B., Fu, J., Chen, P., Ge, X., Li, Y., Kuatse, I., Orłowski, R. Z. (2015). The Nuclear Factor (Erythroid-derived 2)-like 2 and Proteasome Maturation Protein Axis Mediate Bortezomib Resistance in Multiple Myeloma. *Journal of Biological Chemistry*, 290(50), 29854-29868.
- Li, T., Li, D., Sha, J., Sun, P. ve Huang, Y. (2009). MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 383(3), 280-285.
- Li, Y., Chen, F., Chen, J., Chan, S., He, Y., Liu, W. ve Zhang, G. (2020). Disulfiram/Copper Induces Antitumor Activity against Both Nasopharyngeal Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts through ROS/MAPK and Ferroptosis Pathways. *Cancers*, 12(1).
- Liu, C., Qiang, J., Deng, Q., Xia, J., Deng, L., Zhou, L., Liu, S. (2021). ALDH1A1 Activity in Tumor-Initiating Cells Remodels Myeloid-Derived Suppressor Cells to Promote Breast Cancer Progression. *Cancer Research*, 81(23), 5919-5934.
- Liu, P., Wang, Z., Brown, S., Kannappan, V., Tawari, P. E., Jiang, W., Wang, W. (2014). Liposome encapsulated Disulfiram inhibits NFκB pathway and targets breast cancer stem cells *in vitro* and *in vivo*. *Oncotarget*, 5(17), 7471-7485.



- Lövborg, H., Öberg, F., Rickardson, L., Gullbo, J., Nygren, P. ve Larsson, R. (2006). Inhibition of proteasome activity, nuclear factor- $\kappa$ B translocation and cell survival by the antialcoholism drug disulfiram. *International Journal of Cancer*, 118(6), 1577-1580.
- Maffei, R., Colaci, E., Fiorcari, S., Martinelli, S., Potenza, L., Luppi, M. ve Marasca, R. (2016). Lenalidomide in chronic lymphocytic leukemia: the present and future in the era of tyrosine kinase inhibitors. *Critical reviews in oncology/hematology*, 97, 291-302.
- Mancias, J. D., Wang, X., Gygi, S. P., Harper, J. W. ve Kimmelman, A. C. (2014). Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy. *Nature*, 509(7498), 105-109.
- Mandal, S., Mandal, A. ve Park, M. H. (2015). Depletion of the polyamines spermidine and spermine by overexpression of spermidine/spermine N 1-acetyltransferase 1 (SAT1) leads to mitochondria-mediated apoptosis in mammalian cells. *Biochemical Journal*, 468(3), 435-447.
- McBride, A., Klaus, J. O. ve Stockerl-Goldstein, K. (2015). Carfilzomib: a second-generation proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*, 72(5), 353-60.
- McDaniel, J. M., Pinilla-Ibarz, J. ve Epling-Burnette, P. K. (2012). Molecular action of lenalidomide in lymphocytes and hematologic malignancies. *Advances in hematology*, 2012, 513702.
- McGivan, J. D. (2007). The transport of glutamine into mammalian cells. *Frontiers in Bioscience*, 12(1), 874.
- Micallef, J., Taccone, M., Mukherjee, J., Croul, S., Busby, J., Moran, M. F. ve Guha, A. (2009). Epidermal Growth Factor Receptor Variant III–Induced Glioma Invasion Is Mediated through Myristoylated Alanine-Rich Protein Kinase C Substrate Overexpression. *Cancer Research*, 69(19), 7548-7556.
- Mitsiades, N., Mitsiades, C. S., Poulaki, V., Chauhan, D., Fanourakis, G., Gu, X., Anderson, K. C. (2002). Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(22), 14374-14379.
- Moalli, P., Pillay, S., Weiner, D., Leikin, R. ve Rosen, S. (1992). A mechanism of resistance to glucocorticoids in multiple myeloma: transient expression of a truncated glucocorticoid receptor mRNA. *Blood*, 79(1), 213-222.
- Moreau, P., Attal, M. ve Facon, T. (2015). Frontline therapy of multiple myeloma. *Blood*, 125(20), 3076-3084.

- Moreaux, J., Rème, T., Leonard, W., Veyrune, J.-L., Requirand, G., Goldschmidt, H., Klein, B. (2012). Development of Gene Expression–Based Score to Predict Sensitivity of Multiple Myeloma Cells to DNA Methylation Inhibitors. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(12), 2685-2692.
- Mou, Y., Zhang, L., Liu, Z. ve Song, X. (2022). Abundant expression of ferroptosis-related SAT1 is related to unfavorable outcome and immune cell infiltration in low-grade glioma. *BMC Cancer*, 22(1), 215.
- Muñoz, M., García-Erce, J. A. ve Remacha, Á. F. (2011). Disorders of iron metabolism. Part 1: molecular basis of iron homoeostasis. *Journal of Clinical Pathology*, 64(4), 281-286.
- Ni, Y.-L., Chien, P.-J., Hsieh, H.-C., Shen, H.-T., Lee, H.-T., Chen, S.-M. ve Chang, W.-W. (2022). Disulfiram/Copper Suppresses Cancer Stem Cell Activity in Differentiated Thyroid Cancer Cells by Inhibiting BMI1 Expression. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 13276.
- Niewerth, D., Jansen, G., Assaraf, Y. G., Zweegman, S., Kaspers, G. J. L. ve Cloos, J. (2015). Molecular basis of resistance to proteasome inhibitors in hematological malignancies. *Drug Resistance Updates*, 18, 18-35.
- Niewerth, D., Jansen, G., Riethoff, L. F. v., van Meerloo, J., Kale, A. J., Moore, B. S., Cloos, J. (2014). Antileukemic Activity and Mechanism of Drug Resistance to the Marine *Salinispora tropica* Proteasome Inhibitor Salinosporamide A (Marizomib). *Molecular Pharmacology*, 86(1), 12-19.
- Obeng, E. A., Carlson, L. M., Gutman, D. M., Harrington, W. J., Lee, K. P. ve Boise, L. H. (2006). Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood*, 107(12), 4907-4916.
- O'Connor, R., Ooi, M. G., Meiller, J., Jakubikova, J., Klippel, S., Delmore, J., O'Gorman, P. (2013). The interaction of bortezomib with multidrug transporters: implications for therapeutic applications in advanced multiple myeloma and other neoplasias. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 71(5), 1357-1368.
- Oerlemans, R., Franke, N. E., Assaraf, Y. G., Cloos, J., van Zantwijk, I., Berkers, C. R., Jansen, G. (2008). Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit  $\beta 5$  (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood*, 112(6), 2489-2499.
- Orlowski, R. Z., Stinchcombe, T. E., Mitchell, B. S., Shea, T. C., Baldwin, A. S., Stahl, S., Soignet, S. L. (2002). Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with

- refractory hematologic malignancies. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 20(22), 4420-7.
- Ou, Y., Wang, S.-J., Li, D., Chu, B. ve Gu, W. (2016). Activation of SAT1 engages polyamine metabolism with p53-mediated ferroptotic responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(44).
- Pantziarka, P., Bouche, G., Meheus, L., Sukhatme, V., Sukhatme, V. P. ve Vikas, P. (2014). The Repurposing Drugs in Oncology (ReDO) Project. *Ecancermedicalscience*, 8, 442.
- Papa, S., Martino, P. L., Capitanio, G., Gaballo, A., de Rasmio, D., Signorile, A. ve Petruzzella, V. (2012). The Oxidative Phosphorylation System in Mammalian Mitochondria (ss. 3-37).
- Park, E. ve Chung, S. W. (2019). ROS-mediated autophagy increases intracellular iron levels and ferroptosis by ferritin and transferrin receptor regulation. *Cell Death & Disease*, 10(11), 822.
- Pye, V. E., Beuron, F., Keetch, C. A., McKeown, C., Robinson, C. v., Meyer, H. H., Freemont, P. S. (2007). Structural insights into the p97-Ufd1-Npl4 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(2), 467-472.
- Qiang, Y.-W., Ye, S., Chen, Y., Buros, A. F., Edmonson, R., van Rhee, F., Davies, F. E. (2016). MAF protein mediates innate resistance to proteasome inhibition therapy in multiple myeloma. *Blood*, 128(25), 2919-2930.
- Qiu, Y., Cao, Y., Cao, W., Jia, Y. ve Lu, N. (2020). The Application of Ferroptosis in Diseases. *Pharmacological Research*, 159, 104919.
- Rajkumar, S. V., Dimopoulos, M. A., Palumbo, A., Blade, J., Merlini, G., Mateos, M.-V., Miguel, J. F. S. (2014). International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The Lancet. Oncology*, 15(12), e538-48.
- Rees-Unwin, K. S., Craven, R. A., Hanrahan, S., Totty, N. F., Dring, A. M., Banks, R. E., Davies, F. E. (2004). Proteomic Evaluation of Pathways Associated with Dexamethasone-Induced Apoptosis and Resistance in Multiple Myeloma. *Blood*, 104(11), 642-642.
- Ren, X., Li, Y., Zhou, Y., Hu, W., Yang, C., Jing, Q., Du, J. (2021). Overcoming the compensatory elevation of NRF2 renders hepatocellular carcinoma cells more vulnerable to disulfiram/copper-induced ferroptosis. *Redox Biology*, 46, 102122.
- Richardson, P. G., Sonneveld, P., Schuster, M. W., Irwin, D., Stadtmauer, E. A., Facon, T., Assessment of Proteasome Inhibition for Extending Remissions (APEX) Investigators.

- (2005). Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *The New England journal of medicine*, 352(24), 2487-98.
- Robak, P., Drozd, I., Szemraj, J. ve Robak, T. (2018). Drug resistance in multiple myeloma. *Cancer Treatment Reviews*, 70, 199-208.
- Rückrich, T., Kraus, M., Gogel, J., Beck, A., Ovaa, H., Verdoes, M., Driessen, C. (2009). Characterization of the ubiquitin–proteasome system in bortezomib-adapted cells. *Leukemia*, 23(6), 1098-1105.
- Safi, R., Nelson, E. R., Chitneni, S. K., Franz, K. J., George, D. J., Zalutsky, M. R. ve McDonnell, D. P. (2014). Copper Signaling Axis as a Target for Prostate Cancer Therapeutics. *Cancer Research*, 74(20), 5819-5831
- Salem, K., McCormick, M. L., Wendlandt, E., Zhan, F. ve Goel, A. (2015). Copper–zinc superoxide dismutase-mediated redox regulation of bortezomib resistance in multiple myeloma. *Redox Biology*, 4, 23-33.
- Sánchez-Vega, B. ve Gandhi, V. (2009). Glucocorticoid resistance in a multiple myeloma cell line is regulated by a transcription elongation block in the glucocorticoid receptor gene (NR3C1). *British Journal of Haematology*, 144(6), 856-864.
- Schwarzenbach, H. (2002). Expression of MDR1/P-Glycoprotein, the Multidrug Resistance Protein MRP, and the Lung-Resistance Protein LRP in Multiple Myeloma. *Medical Oncology*, 19(2), 87-104.
- Seibt, T. M., Proneth, B. ve Conrad, M. (2019). Role of GPX4 in ferroptosis and its pharmacological implication. *Free Radical Biology and Medicine*, 133, 144-152.
- Shaw, A. T., Winslow, M. M., Magendantz, M., Ouyang, C., Dowdle, J., Subramanian, A., Jacks, T. (2011). Selective killing of K-ras mutant cancer cells by small molecule inducers of oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(21), 8773-8778.
- Shimada, K., Skouta, R., Kaplan, A., Yang, W. S., Hayano, M., Dixon, S. J., Stockwell, B. R. (2016). Global survey of cell death mechanisms reveals metabolic regulation of ferroptosis. *Nature Chemical Biology*, 12(7), 497-503.
- Shui, S., Zhao, Z., Wang, H., Conrad, M. ve Liu, G. (2021). Non-enzymatic lipid peroxidation initiated by photodynamic therapy drives a distinct ferroptosis-like cell death pathway. *Redox Biology*, 45, 102056.
- Siegel, R. L., Miller, K. D. ve Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians*, 66(1), 7-30.

- Skrott, Z., Majera, D., Gursky, J., Buchtova, T., Hajduch, M., Mistrik, M. ve Bartek, J. (2019). Disulfiram's anti-cancer activity reflects targeting NPL4, not inhibition of aldehyde dehydrogenase. *Oncogene*, 38(40), 6711-6722.
- Stewart, A. K., Rajkumar, S. V., Dimopoulos, M. A., Masszi, T., Špička, I., Oriol, A., AS-PIRE Investigators. (2015). Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *The New England journal of medicine*, 372(2), 142-52.
- Stockwell, B. R., Friedmann Angeli, J. P., Bayir, H., Bush, A. I., Conrad, M., Dixon, S. J., Zhang, D. D. (2017). Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell*, 171(2), 273-285.
- Sullivan, L. B. ve Chandel, N. S. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer & Metabolism*, 2(1), 17.
- Suzuki, E., Demo, S., Deu, E., Keats, J., Arastu-Kapur, S., Bergsagel, P. L., Kirk, C. J. (2011). Molecular Mechanisms of Bortezomib Resistant Adenocarcinoma Cells. *PLoS ONE*, 6(12), e27996.
- Tang, D., Chen, X., Kang, R. ve Kroemer, G. (2021). Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications. *Cell Research*, 31(2), 107-125.
- Tang, Z., Xu, Z., Zhu, X. ve Zhang, J. (2021). New insights into molecules and pathways of cancer metabolism and therapeutic implications. *Cancer Communications*, 41(1), 16-36.
- Terman, A. ve Kurz, T. (2013). Lysosomal Iron, Iron Chelation, and Cell Death. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(8), 888-898.
- Turner, J. G., Gump, J. L., Zhang, C., Cook, J. M., Marchion, D., Hazlehurst, L., Sullivan, D. M. (2006). ABCG2 expression, function, and promoter methylation in human multiple myeloma. *Blood*, 108(12), 3881-3889.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., vanden Berghe, T. ve Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(10), 700-714.
- Verbrugge, S. E., Assaraf, Y. G., Dijkmans, B. A. C., Scheffer, G. L., Al, M., den Uyl, D., ... Jansen, G. (2012). Inactivating *PSMB5* Mutations and P-Glycoprotein (Multidrug Resistance-Associated Protein/ATP-Binding Cassette B1) Mediate Resistance to Proteasome Inhibitors: Ex Vivo Efficacy of (Immuno)Proteasome Inhibitors in Mononuclear Blood Cells from Patients with Rheumatoid Arthritis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 341(1), 174-182.

- Viziteu, E., Kassambara, A., Pasero, P., Klein, B. ve Moreaux, J. (2016). RECQ helicases are deregulated in hematological malignancies in association with a prognostic value. *Biomarker Research*, 4(1), 3.
- Wang, H., An, P., Xie, E., Wu, Q., Fang, X., Gao, H., Wang, F. (2017). Characterization of ferroptosis in murine models of hemochromatosis. *Hepatology*, 66(2), 449-465.
- Wang, Y., Dawson, V. L. ve Dawson, T. M. (2009). Poly (ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: A key event in parthanatos. *Experimental Neurology*, 218(2), 193-202.
- Weiser Drozdkova, D. ve Smesny Trtkova, K. (2021). Possible Therapeutic Potential of Disulfiram for Multiple Myeloma. *Current Oncology*, 28(3), 2087-2096.
- Wenzel, S. E., Tyurina, Y. Y., Zhao, J., st. Croix, C. M., Dar, H. H., Mao, G., Kagan, V. E. (2017). PEBP1 Wardens Ferroptosis by Enabling Lipoxygenase Generation of Lipid Death Signals. *Cell*, 171(3), 628-641.e26.
- Wu, W., Yu, L., Jiang, Q., Huo, M., Lin, H., Wang, L., Shi, J. (2019). Enhanced Tumor-Specific Disulfiram Chemotherapy by *In Situ* Cu<sup>2+</sup> Chelation-Initiated Nontoxicity-to-Toxicity Transition. *Journal of the American Chemical Society*, 141(29), 11531-11539.
- Xu, Y., Zhou, Q., Feng, X., Dai, Y., Jiang, Y., Jiang, W., Zheng, C. (2020). Disulfiram/copper markedly induced myeloma cell apoptosis through activation of JNK and intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 126, 110048.
- Yanatori, I. ve Kishi, F. (2019). DMT1 and iron transport. *Free Radical Biology and Medicine*, 133, 55-63.
- Yang, W. S., Kim, K. J., Gaschler, M. M., Patel, M., Shchepinov, M. S. ve Stockwell, B. R. (2016). Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(34).
- Yang, W. S. ve Stockwell, B. R. (2008). Synthetic Lethal Screening Identifies Compounds Activating Iron-Dependent, Nonapoptotic Cell Death in Oncogenic-RAS-Harboring Cancer Cells. *Chemistry & Biology*, 15(3), 234-245.
- Yang, Y., Chen, Y., Saha, M. N., Chen, J., Evans, K., Qiu, L., Chang, H. (2015). Targeting phospho-MARCKS overcomes drug-resistance and induces antitumor activity in preclinical models of multiple myeloma. *Leukemia*, 29(3), 715-726.
- Yarde, D. N., Oliveira, V., Mathews, L., Wang, X., Villagra, A., Boulware, D., Dalton, W. S. (2009). Targeting the Fanconi Anemia/BRCA Pathway Circumvents Drug Resistance in Multiple Myeloma. *Cancer Research*, 69(24), 9367-9375.
- Yin, H., Xu, L. ve Porter, N. A. (2011). Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chemical Reviews*, 111(10), 5944-5972.

- Yip, N. C., Fombon, I. S., Liu, P., Brown, S., Kannappan, V., Armesilla, A. L., Wang, W. (2011). Disulfiram modulated ROS–MAPK and NFκB pathways and targeted breast cancer cells with cancer stem cell-like properties. *British Journal of Cancer*, 104(10), 1564-1574.
- Youssef, G. ve Miller, J. J. (2020). Lower Grade Gliomas. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 20(7), 21.
- Yuan, H., Li, X., Zhang, X., Kang, R. ve Tang, D. (2016). Identification of ACSL4 as a biomarker and contributor of ferroptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 478(3), 1338-1343.
- Yuan, J. ve Kroemer, G. (2010). Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes & Development*, 24(23), 2592-2602.
- Zha, J., Chen, F., Dong, H., Shi, P., Yao, Y., Zhang, Y., Xu, B. (2014). Disulfiram targeting lymphoid malignant cell lines via ROS-JNK activation as well as Nrf2 and NF-kB pathway inhibition. *Journal of Translational Medicine*, 12(1), 163.
- Zhao, Yan, Huang, Z. ve Peng, H. (2021). Molecular Mechanisms of Ferroptosis and Its Roles in Hematologic Malignancies. *Frontiers in Oncology*, 11.
- Zhao, Yang, Chen, Y.-Q., Bonacci, T. M., Bredt, D. S., Li, S., Bensch, W. R., Cao, G. (2008). Identification and Characterization of a Major Liver Lysophosphatidylcholine Acyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 283(13), 8258-8265.
- Zhou, B., Liu, J., Kang, R., Klionsky, D. J., Kroemer, G. ve Tang, D. (2020). Ferroptosis is a type of autophagy-dependent cell death. *Seminars in Cancer Biology*, 66, 89-100.