

**T.C.
AFYONKARAHİSAR
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

**MULTİPLE MİYELOMA'DA TOLL LIKE
RESEPTÖRLERİ VE SİNYAL YOLU
BİLEŞENLERİNİN HASTALIK PATOLOJİSİYLE
İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

Kamuran AVCI

DOKTORA TEZİ

**Danışman
Prof. Dr. Müjgan ÖZDEMİR ERDOĞAN**

2022 - AFYONKARAHİSAR

**T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

**MULTİPLE MİYELOMA'DA
TOLL LIKE RESEPTÖRLERİ VE SİNYAL YOLU BİLEŞENLERİNİN
HASTALIK PATOLOJİSİYLE
İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

Kamuran AVCI

DOKTORA TEZİ

**Danışman
Prof. Dr. Müjgan ÖZDEMİR ERDOĞAN**

**Bu tez Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından 19.DOK.003 proje numarası ile desteklenmiştir.**

2022- AFYONKARAHİSAR

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamda her zaman yolumu aydınlatan, çalışmanın ve en zorlu koşullarda bile azimle görevine devam etmenin en güzel örneği olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Müjgan ÖZDEMİR ERDOĞAN'a verdiği sonsuz destek ve yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Doktora eğitimimin süresince, bilgi ve deneyimlerini hiç esirgemeyen, çalışmanın ve görev bilincinin en güzel örneği olan kıymetli hocam Prof. Dr. Saliha Handan YILDIZ'a verdiği sonsuz destek ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Öğretim görevlisi yetiştirme programı aracılığıyla eğitime imkân sağlayan ve tez çalışmamda tüm akademik fırsatları sunan Prof. Dr. Mustafa SOLAK hocama, saygı ve şükranlarımı sunarım.

Birlikte çalıştığım ve her konuda yardımlarından istifade ettiğim Doç. Dr. Muhsin ELMAS hocama ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde büyük emeği olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli aileme, koşulsuz sevgi ve desteğini her durumda hissettiğim değerli eşime sonsuz teşekkür ederim.

Kamuran AVCI

Afyonkarahisar, Aralık

MULTİPLE MİYELOMA'DA
TOLL LIKE RESEPTÖRLERİ VE SİNYAL YOLU BİLEŞENLERİNİN
HASTALIK PATOLOJİSİYLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

Kamuran Avcı

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Doktora Tezi

Aralık

Danışman: Prof. Dr. Müjgan ÖZDEMİR ERDOĞAN

ÖZET

Multiple miyeloma (MM) genellikle 50 yaş üzerinde ortaya çıkmaktadır. Kemik lezyonları ile karakterize bir plazma hücre malignitesidir. Tedavi, kemoterapi ajanları, immünomodülatörler ve proteazom inhibitörleriyle (Pİ) yapılmaktadır. MM hücreleri tüm ökaryotik hücrelerde hayati öneme sahip proteazomun mutant bir formuna sahip olduğu için Pİ'ler tedavide oldukça etkili ve kullanışlıdır. Karfilzomib ve İksazomib, immünoproteazom üzerinde farklı etki mekanizmalarına sahip ikinci nesil Pİ'lerdir. Diğer taraftan, apoptozdan kurtulma terapide MM hücre sağ kalımının ana mekanizmalarından biri olarak öne çıkmaktadır. Venetoklaks, antiapoptotik proteinlere seçici olarak bağlanan ve proapoptotik proteinler üzerindeki aktivitelerini inhibe eden bir ajandır. Çeşitli hematolojik malignitelerin tedavisinde kullanımı onaylanmıştır. Günümüzde bu ajanların kombinasyonel kullanımıyla MM tedavisinde daha etkili ve düşük toksisiteli antitümör sistemlerinin geliştirilmesi hedeflenmektedir. Bunlara ek olarak MM tedavisinde farklı seçeneklerin üretilmesi araştırma konusudur. Toll like reseptörlerinin (TLR) fonksiyonunun deşifre edilmesi ve kanser tedavisinde kullanılabilecek mekanizmalardaki rolünün anlaşılması önemlidir. Bu nedenle MM hücrelerindeki TLR'lerin terapide ilaca duyarlılaştırma stratejisi olarak kullanımı yakın zamanda ön plana çıkmıştır.

Bu bağlamda çalışmanın amacı, TLR1/2 agonisti, anti-apoptotik protein inhibitörü ve yeni nesil proteazom inhibitörlerinin kombinasyonel kullanımının antikanser etkinliğinde sinerjisini araştırmaktır. MM modeli olarak U266, RPMI 8226 ve NCI H929 hücre hatları kullanıldı. TLR1/2 agonisti Pam₃CSK₄, anti-apoptotik protein inhibitörü Venetoklaks, yeni nesil proteazom inhibitörleri Karfilzomib ve İksazomib ajanları ile deney uygulamaları yapıldı. Hücre proliferasyonları, gen ekspresyon profilleri, anti-apoptotik yanıtlar ve sitotoksik direnç mekanizmaları agonist ve inhibitör kombinasyonlarıyla analiz edildi. Proliferasyon, gen ekspresyonu ve protein kantitasyonu sırasıyla WST, RT-PCR ve Western Blot teknikleriyle incelendi.

TLR1/2 ligandı Pam₃CSK₄ varlığında, 3 hücre hattında TLR sinyal yolunun aktivasyonu gerçekleşti. Anti-apoptotik protein inhibitörü verimli şekilde hücre ölümünü indükledi. Karfilzomib, İksazomib'e göre doza ve zamana bağlı olarak daha etkili inhibisyona ve apoptoza yol açtı. Proliferasyonun inhibitörler ve hücre hatları arasında heterojen olduğu gözlemlendi. Normal kültür koşullarında elde edilen IC₅₀ değerlerinin TLR1/2 agonistli ve anti-apoptotik protein inhibitörlü kombinasyonlara göre daha düşük olduğu gözlemlendi. TLR1/2 sinyal yolunda görevli adaptör proteinlerin ve apoptoz ilişkili proteinlerin gen ekspresyonunda oldukça heterojen bir profili bulundu. Benzer şekilde TLR1/2 sinyal yoluna ve kemoterapik ajanlara bağlı gelişen apoptotik proteinlerin ekspresyonunda oldukça heterojen bir profil belirlendi.

Bulgularımız, MM hücrelerinde proteazom inhibitörleri aracılığıyla oluşturulan stresin gerek apoptotik protein inhibitörleri gerekse TLR sinyal yolunu uyarıcı ligandlarla modülasyon potansiyelini gösterdi. Verilerimiz MM tedavisinde TLR agonistlerinin, yeni nesil proteazom inhibitörlerinin ve anti-apoptotik protein inhibitörlerinin kombinasyonlarının etkili olabileceği göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Multipl Miyeloma, Toll-like Reseptör, Karfilzomib, İksazomib, Venetoklaks, Apoptoz

**INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP OF TOLL LIKE RECEPTORS
AND SIGNAL PATH COMPONENTS WITH DISEASE PATHOLOGY IN
MULTIPLE MYELOMA**

Kamuran Avcı

Afyonkarahisar University of Health Sciences

Institute of Graduate Education Department of Medical Genetics PhD Thesis

December

Supervisor: Prof. Dr. Müjgan ÖZDEMİR ERDOĞAN

ABSTRACT

Multiple myeloma (MM) usually occurs over the age of 50. It is a plasma cell malignancy characterized by bone lesions. Treatment is carried out with chemotherapy agents, immunomodulators and proteasome inhibitors (PI). Since MM cells have a mutant form of the proteasome, which is vital in all eukaryotic cells, PIs are very effective and useful in treatment. Carfilzomib and Ixazomib are second generation PIs with different mechanisms of action on the immunoproteasome. On the other hand, recovery from apoptosis stands out as one of the main mechanisms of MM cell survival in therapy. Venetoclax is an agent that selectively binds to anti-apoptotic proteins and inhibits activity on pro-apoptotic proteins. It is approved for use in the treatment of various hematological malignancies. Today, it is aimed to develop more effective and low-toxicity anti-tumor systems with the combinational use of these agents in the treatment of MM. In addition, the production of different options in the treatment of MM is the subject of research. It is important to decipher the function of Toll like receptors (TLR) and to understand their role in the mechanisms that can be used in cancer treatment. Therefore, the use of TLRs in MM therapy as a drug sensitization strategy in therapy has recently come to the fore.

In this context, the aim of the study was to investigate the synergy of combinational usage of TLR1/2 agonist, anti-apoptotic protein inhibitor and next generation proteasome inhibitors in anti-cancer effect. MM model consisted of U266, RPMI 8226 and NCI H929 cell lines. TLR1/2 agonist Pam₃CSK₄, anti-apoptotic protein inhibitor Venetoclax, new generation proteasome inhibitors Carfilzomib and Ixazomib were applied in experiments. Cell proliferations, gene expression profiles, anti-apoptotic responses and cytotoxic resistance mechanisms were analyzed with agonist and inhibitor combinations. Proliferation, gene expression and protein expressions were investigated respectively with WST, RT-PCR and Western Blot techniques.

TLR signaling pathway was activated in 3 cell lines in the presence of TLR1/2 ligand Pam₃CSK₄. The anti-apoptotic protein inhibitor efficiently induced cell death.

Carfilzomib caused more effective inhibition and apoptosis in a dose and time-dependent content compared to Ixasomib. Proliferation was observed to be heterogeneous between inhibitors and cell lines. It was observed that IC50 values obtained under normal culture conditions were lower than combinations with TLR1/2 agonist and anti-apoptotic protein inhibitor. Highly heterogeneous profiles were found in gene expression of adapter proteins and apoptosis-related proteins involved in the TLR1/2 signaling pathway. Similarly, highly heterogeneous profiles were determined in the expression of apoptotic proteins that develops due to TLR1/2 signaling pathway and chemotherapeutic agents.

Our findings demonstrated the potential for modulation of proteasome inhibitor-mediated stress in MM cells with both apoptotic protein inhibitors and ligands stimulating the TLR signaling pathway. Our data show that combinations of TLR agonists, new generation proteasome inhibitors and anti-apoptotic protein inhibitors may be effective in the treatment of MM.

Keywords: Multiple Myeloma; Toll-like Receptor; Carfilzomib; Ixasomib; Venetoclax; Apoptosis

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	18
2. GENEL BİLGİLER	22
2.1. Multiple Miyeloma.....	22
2.1.1. Tanımı.....	22
2.1.2. Epidemiyoloji.....	22
2.1.3. Patogenez	23
2.1.4. Klinik Özellikler	23
2.1.5. Teşhis ve Evreleme.....	27
2.1.6. Prognoz	28
2.1.7. Tedavi Yöntemleri	28
2.1.8. Proteozom İnhibitörleri ve Multiple Miyeloma Tedavisindeki Önemi	29
2.1.8.1. Bortezomib.....	31
2.1.8.2. Karfilzomib	33
2.1.8.3. İksazomib	34
2.1.8.4. Venetoklaks.....	36
2.1.9. Multiple Miyelom'da Alternatif Tedavi Yöntemleri	40
2.2. Toll Like Reseptörleri	43
2.2.1. Toll Like Reseptörleri ve Kanseri İlişkisi	44
2.2.2. Toll Like Reseptörlerinin Yapısı.....	46
2.2.3. Toll Like Reseptörleri ve Ligand Etkileşimi.....	51
2.2.4. Toll Like Reseptörleri Sinyal İletimi	52
2.2.4.1. MyD88 Bağımlı Sinyal Yolu	53
2.2.4.2. Toll İnterlökini 1 Reseptör Domaini İçeren Adaptör Proteine Bağımlı Sinyal Yolu	54
2.2.5. Toll Like Reseptörü 1/2 Ligand Etkileşimi ve Sinyalizasyonu	55

2.2.6.	Toll Like Reseptörleri 1/2 ve Hücre Apoptozu.....	56
2.2.7.	Toll Like Reseptörleri ve Multiple Miyeloma Hücrelerinde Ekspresyonu 58	
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	61
3.1.	Kullanılan Cihazlar.....	61
3.2.	Kullanılan Kimyasallar.....	61
3.3.	Kullanılan Kitler.....	62
3.4.	U266, RPMI 8226 ve NCI H929 Hücre Hatları	62
3.5.	Yöntemler	63
3.5.1.	İlaç Stoklarının Hazırlanması.....	63
3.5.2.	Toll Like Reseptörleri 1/2 Reseptör Ligandı Pam ₃ CSK ₄ Stoklarının Hazırlanması	64
3.5.3.	Hücre Kültür Ortamının Hazırlanışı.....	64
3.5.4.	Hücre Kültürü Uygulamaları.....	64
3.5.5.	Hücre Kültüründe Ligand Uygulaması	64
3.5.6.	Hücre Kültüründe İnhibitör Uygulaması	64
3.5.7.	Hücre Canlılığının Belirlenmesi	64
2.3.4.	Hücrelerden Total RNA İzolasyonu	65
2.3.5.	Komplementer DNA (Complementary DNA, cDNA) sentezi	66
2.3.6.	Gen İfade Düzeylerinin Real-Time PCR ile Ölçümü	67
2.3.7.	Total Protein İzolasyonu	69
2.3.8.	BCA Kiti ile Protein Miktar Tayini	69
2.3.9.	Western Blot Yöntemi ile Protein Düzeylerinin Belirlenmesi	70
3.6.	İstatistiksel Analiz	72
4.	BULGULAR.....	73
4.1.	Hücre Canlılığı Sonuçları	73
4.2.	Gen İfade Düzeylerinin Sonuçları	76
4.2.1.	<i>BCL2</i> Geni İfade Düzeyi Sonuçları.....	77
4.2.2.	<i>BCLXL</i> Geni İfade Düzeyi Sonuçları	80
4.2.3.	<i>CASP3</i> Geni İfade Düzeyi Sonuçları	80
4.2.4.	<i>IRAK4</i> Geni İfade Düzeyi Sonuçları	81
4.2.5.	<i>MCL1</i> Geni İfade Düzeyi Sonuçları.....	82
4.2.6.	<i>MyD88</i> Geni İfade Düzeyi Sonuçları.....	83
4.2.7.	<i>TRAF6</i> Geni İfade Düzeyi Sonuçları	84
4.3.	Protein Ekspresyon Sonuçları	89

4.3.1.	Kaspaz 3 Protein Ekspresyon Sonuçları	89
4.3.2.	Bid Protein Ekspresyon Sonuçları	90
5.	TARTIŞMA	95
5.1.	Hücre Canlılığı Sonuçlarının Değerlendirilmesi	96
5.1.1.	Normal Kültür Koşullarında Tek İnhibitörlü IC ₅₀ Sonuçlarının Değerlendirilmesi	98
5.1.2.	Toll Like Reseptörleri Stimülasyonlu Kültür Koşullarında IC ₅₀ Sonuçlarının Değerlendirilmesi	102
5.1.3.	Toll Like Reseptörleri Stimülasyonlu Kültür Koşullarında Kombine İnhibitörlü IC ₅₀ Sonuçlarının Değerlendirilmesi	104
5.2.	Genlerin İfade Düzeyi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	107
5.2.1.	Anti-apoptotik Genlerin İfade Düzeyi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	107
5.2.1.1.	<i>BCL2</i> Geni İfade Düzeyi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	108
5.2.1.2.	<i>BCLXL</i> Geni İfade Düzeyi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	111
5.2.1.3.	<i>MCL1</i> Geni İfade Düzeyi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	113
5.2.2.	Apoptotik Gen İfade Düzeyi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	116
5.2.2.1.	<i>CASP3</i> Geni İfade Düzeyi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	117
5.2.3.	Toll Like Reseptörleri 1/2 Sinyal Yolu Bileşeni Genlerin İfade Düzeyi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	119
5.2.3.1.	<i>IRAK4</i> Geni İfade Düzeyi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	120
5.2.3.2.	<i>MyD88</i> Geni İfade Düzeyi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	121
5.2.3.3.	<i>TRAF6</i> Geni İfade Düzeyi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	122
5.3.	Protein Ekspresyon Verilerinin Değerlendirilmesi	123
5.3.1.	Kaspaz 3 Protein Ekspresyon Verilerinin Değerlendirilmesi	124
5.3.2.	Bid Protein Ekspresyon Verilerinin Değerlendirilmesi	127
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	130
	KAYNAKLAR	132
	EKLER	145
	EK-1: İntihal Yazılım Programı Raporu	145
	ÖZGEÇMİŞ	146

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALL	Akut Lenfositik Lösemi (Acute Lymphocytic Leukaemia)
AML	Akut Myelositik Lösemi (Acute Myelocytic Leukaemia)
APAF1	Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör 1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1)
ASCT	Otolog Kök Hücre Nakli Tedavisi
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Bid	BH3 Etkileşimli Ölüm Domaini (BH3 Interacting Domain Death)
BMSC	Kemik İliği Stromal Hücreleri (Bone Marrow Stromal Cells)
BTZ	Bortezomib
β 2m	β 2-Microglobulin
cDNA	Komplementer DNA (Complementary DNA)
CD34+	sınıflandırma faktörü 34 pozitif (classification determinant positive)
CFZ	Carfizomib
CR	Tam Remisyon (Complete Remission)
CRP	C-Reaktif Protein
CytC	Sitokrom C (Cytochrome C)
DAMPS	Hasara Bağlı Moleküler Paternler (Damage-Associated Molecular Patterns)
DD	Ölüm Domaini (Death Domain)
DED	Ölüm Efektör Domaini (Death Effector Domain)
DEX	Dexamethasone
DLBCL	Difüze Büyük B Hücreli Lenfoma (Diffused Large B-Cell Lymphoma)
DSS	Durie-Salmon Evrelemesi

dsRNA	ift sarmallı RNA (double strand RNA)
DTB	Daratumumab
ECM	Hücre Dışı Matriksi (Extra Cellular Matrix)
EMA	Avrupa İla Ajansı (European Medicines Agency)
ER	Endoplazmik Retikulum
ERAD	ER İlişkili Bozunma Sistemi (ER-Associated Degradation)
ETB	Elotuzumab
FADD	Fas/Apo-1 İlişkili Ölüm Domain (Fas/Apo-1-Associated Death Domain)
FDA	ABD Gıda ve İla Dairesi (The USA Food and Drug Administration)
FL	Foliküler Lenfoma
HDAC	Histon Deasetilazlar (Histone Deacetylase)
HMCL	İnsan Miyelom Hücre Hatları (Human Myeloma Cell Line)
IFM	Uluslararası Miyeloma Derneği (International Foundation of Myeloma)
IFN	İnterferon
Ig	İmmünoglobulin
Igd	İmmünoglobulin D
IGF1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (Insulin Like Growth Factor - 1)
IL-1	İnterlökin 1
IL-6	İnterlökin 6
IL-10	İnterlökin 10
IL-12	İnterlökin 12
IMiD	İmmünomodölatör ila (Immunomodulatory Drug)
IMWG	Uluslararası Miyeloma alışma Grubu (International Myeloma Working Group)

IRAK4	İnterlökün-1 Reseptörü İlişkili Kinaz 4 (Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 4)
IRF3	IFN düzenleyici faktör 3 (IFN regulatory factor 3)
ISS	Uluslararası Evreleme Sistemi (International Staging System)
IXS	Iksazomib
KLL	Kronik Lenfositik Lösemi (Chronic Lymphocytic Leukaemia)
LCDD	Hafif Zincir Depolanma Hastalığı (Light-Chain Deposition Disease)
LDH	Laktik Dehidrojenaz (Lactic Dehydrogenase)
LLD	Lenalidomid
MAPK	Mitojenle Aktive Edilmiş Protein Kinazlar (Mitogen-Activated Protein Kinase)
MCL	Manto Hücre Lenfoması (Mantle Cell Lymphoma)
MGUS	Önemi Saptanmamış Monoklonal Gammopati (Mono Clonal Gammopathy of Undetermined Significance)
ml	Mililitre
MM	Multipl Miyeloma
MOM	Mitokondriyal Dış Zarların (Mitochondrial Outer Membranes)
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme (Magnetic Resonance Imaging)
mRNA	Mesajcı RNA (Messenger RNA)
MTD	Tolere Edilen En Yüksek Doz (Maximum Tolerated Dose)
mV	Milivolt
μ M	Mikromolar
MVD	Mikrokürecik Yoğunluğu (Microvessel Density)
MyD88	Miyeloid Farklılaşma Birincil Yanıt Proteini (Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88)
nM	Nanomolar
PAMP	Patojenle İlişkili Moleküler Paternler (Pathogen-Associated Molecular Patterns)

PBT	Panobinostat
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
Pdc	Plazmastoid Dendritik Hücre Sayısı (Plasmacytoid Dendritic Cells)
PET-CT	Bilgisayarlı Pozitron Emisyon Tomografisi (Computed Positron Emission Tomography)
PI	Proteozom İnhibitörü (Proteasome Inhibitor)
PMD	Pomalidomide
RFLP	Restriksiyon Fragment Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism)
SDF	Stromal Hücre Kaynaklı Büyüme Faktörü (Stromal Cell Derived Growth Factor)
TAB1	TAK1 Bağlayıcı Protein 1 (TAK1-Binding Protein 1)
TAB2	TAK1 Bağlayıcı Protein 2 (TAK1-Binding Protein 2)
TAK1	Transforme Edici Aktiflenmiş Büyüme Faktörü-B Kinaz 1 (Transforming Growth Factor-B Activated Kinase 1)
TIR	Toll/interlökin-1 Reseptör (Toll/interleukin-1 Receptor)
TIRAP	Toll interlökin 1 reseptör domaini içere adaptör protein (Toll-interleukin 1 receptor domain-containing adapter protein)
TLD	Talidomid
TNF- α	Tümör nekroz faktörü α (Tumor necrosis factor α)
TRAF6	Tümör-Nekroz Faktör Reseptörü İlişkili Faktör 6 (Tumor-Necrosis Factor-Receptor-Associated Factor 6)
TRAM	TRIF İlişkili Adaptör Molekülü (TRIF-Related Adaptor Molecule)
TRIF	IFN- β İndükleyen TIR Alan İçeren Adaptör Protein (TIR Domain-Containing Adaptor Protein Inducing IFN- β)
TRIF	IFN- β indükleyen TIR domaini içeren adaptör protein (TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN- β)
UPP	Ubikitin Proteazom Yolağı (Ubiquitin-Proteasome Pathway)
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor)
WST-1	Water Soluble Tetrazolium
Yopp	Yersinia Dış Protein P (Yersinia Outer Protein P)

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1: Multipl miyelomun klinik özellikleri (Greer ve ark., 2018; Turgeon, 2012).....	28
Tablo 2.2: MM’da uluslararası evreleme sistemleri (Dimopoulos ve ark., 2018; Oliver ve ark., 2018).....	29
Tablo 2.3: İnsandaki Toll Like reseptörlerinin genel özellikleri. (Harsini ve ark., 2014; Isaza-Correa ve ark., 2014; Kanzler ve ark., 2007; Thakur ve ark., 2015; Khan ve ark., 2016; So ve Ouchi, 2010).....	50
Tablo 3.1: U266, RPMI 8226 ve NCI H929 hücre hatlarının genel özellikleri (www.dsmz.de , Erişim tarihi: 26 Eylül 2022).	65
Tablo 3.2: U266, RPMI 8226 ve NCI H929 hücrelerinde normal ve Pam ₃ CSK ₄ stimülasyonlu kültür koşullarında CFZ, IXS ve VNT inhibitör uygulama konsantrasyonları.	67
Tablo 3.3: Hedef genlere aitRefSeq ve RT ² qPCR primer assay katalog numaraları...	70
Tablo 3.4: <i>GAPDH</i> , <i>IRAK4</i> , <i>MyD88</i> , <i>TRAF6</i> <i>CASP3</i> <i>BCL2</i> , <i>BCLXL</i> ve <i>MCL1</i> gen bölgeleri için kullanılan Real-Time PCR tepkime karışımı.	70
Tablo 3.5: <i>GAPDH</i> , <i>IRAK4</i> , <i>MyD88</i> , <i>TRAF6</i> <i>CASP3</i> <i>BCL2</i> , <i>BCLXL</i> ve <i>MCL1</i> genlerinin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR programı.....	70
Tablo 3.6: Western blot seperasyon ve toplama jellerinin içeriği.....	73
Tablo 4.1: U266, RPMI 8226 ve NCI H929 hücrelerinde normal ve Pam ₃ CSK ₄ stimülasyonlu kültür koşullarında Karfilzomib, Iksazomib ve Venetoklaks inhibitörlerinin tekil ve kombine uygulamalarında elde edilen IC ₅₀ değerleri.....	77
Tablo 4.2: U266 hücre hattında normal ve Pam ₃ CSK ₄ stimülasyonlu kültür koşullarında Karfilzomib inhibitörünün tekil ve Venetoklaks ile kombine uygulamasında <i>BCL2</i> ,	

BCLXL, *CASP3*, *IRAK4*, *MCL1*, *MyD88* ve *TRAF6* genlerinde gözlenen mRNA ekrespresyon değişimleri (*; $p<0,05$). 88

Tablo 4.3: U266 hücre hattında normal ve Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında İksazomib inhibitörünün tekil ve Venetoklaks ile kombine uygulamasında *BCL2*, *BCLXL*, *CASP3*, *IRAK4*, *MCL1*, *MyD88* ve *TRAF6* genlerinde gözlenen mRNA ekrespresyon değişimleri (*; $p<0,05$). 88

Tablo 4.4: RPMI 8226 hücre hattında normal ve Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında Karfilzomib inhibitörünün tekil ve Venetoklaks ile kombine uygulamasında *BCL2*, *BCLXL*, *CASP3*, *IRAK4*, *MCL1*, *MyD88* ve *TRAF6* genlerinde gözlenen mRNA ekrespresyon değişimleri (*; $p<0,05$). 89

Tablo 4.5: RPMI 8226 hücre hattında normal ve Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında İksazomib inhibitörünün tekil ve Venetoklaks ile kombine uygulamasında *BCL2*, *BCLXL*, *CASP3*, *IRAK4*, *MCL1*, *MyD88* ve *TRAF6* genlerinde gözlenen mRNA ekrespresyon değişimleri (*; $p<0,05$). 89

Tablo 4.6: NCI H929 hücre hattında normal ve Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında Karfilzomib inhibitörünün tekil ve Venetoklaks ile kombine uygulamasında *BCL2*, *BCLXL*, *CASP3*, *IRAK4*, *MCL1*, *MyD88* ve *TRAF6* genlerinde gözlenen mRNA ekrespresyon değişimleri (*; $p<0,05$). 90

Tablo 4.7: NCI H929 hücre hattında normal ve Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında İksazomib inhibitörünün tekil ve Venetoklaks ile kombine uygulamasında *BCL2*, *BCLXL*, *CASP3*, *IRAK4*, *MCL1*, *MyD88* ve *TRAF6* genlerinde gözlenen mRNA ekrespresyon değişimleri (*; $p<0,05$). 90

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: 26S Proteozomun yapısı, 20S katalitik çekirdek ve iki 19S düzenleyici birimden oluşan proteaz kompleksidir. Proteozom inhibitörleri β alt birilerini hedeflemek için tasarlanmıştır (Besse ve ark., 2018). 38

Şekil 2.2: BCL2'nin venetoklaks ile sekestrasyonunun etkisi. A) Kanser hücrelerinde aşırı BCL2 ekspresyonu pro-apoptotik proteinleri sekestre ederek apoptozdan kurtulmaya yol açar. B) Venetoklaks özgün biçimde BCL2'ye bağlanır ve programlanmış hücre ölümünü (apoptoz) başlatan pro-apoptotik proteinleri serbest bırakır (Mihalyova ve ark., 2018; Provan ve Gribben, 2020). 41

Şekil 2.3: Mitokondriyal apoptozda etkileşime giren moleküllerin özeti. A) Venetoklaks'ın kimyasal yapısı ve BCL2 ile etkileşimi. B) Venetoklaks BH3 taklidi görevi görür ve BCL2'yi inhibe eder. BAX / BAK aktivasyonu ve bunların dış mitokondriyal membrana delokalizasyonu depolarizasyonla sitokrom c salınımını ve kaspaz aktivasyonu indükler. Sağlıklı hücrelerde BCL2, BAX ve BAK aktivasyonunu repress eder (Crocce ve Reed, 2016; Martens, 2018; Roberts ve ark., 2017). 41

Şekil 2.4: TLR1 - TLR2 heterodimerinin ve ligand bağlanma bölgesinin temsili yapıları. A) TLR yapısını oluşturan 4 kritik bileşen: ligand bağlanma bölgesi, lösin açısından zengin tekrar motifi; transmembran heliksi ve hücre içi TIR domaini. B) TLR1 - TLR2 - Pam₃CSK₄ kompleksinin yatay eksenli moleküler yapısı. C) TLR1 - TLR2 - Pam₃CSK₄ kompleksinin dikey eksenli moleküler yapısı. D) TLR1 - TLR2 - Pam₃CSK₄ kompleksinin yatay eksenli kristal yapısı. E) TLR1 - TLR2 - Pam₃CSK₄ kompleksinin içsel bağlanma bölgesinin kristal yapısı (Jin ve ark., 2007; Manavalan ve ark., 2011; Gao ve ark., 2017). 49

Şekil 2.5: İnsandaki Toll Like reseptörlerini, adaptörlerini, hücresel oryantasyonunu ve ligand örneklerini gösteren şematik diyagram (Kanzler ve ark., 2007). 55

Şekil 2.6: TLR ligandları ve TLR sinyal iletim yolları. Hücre yüzeyinde (1, 2, 4, 5, 6, 10 ve 11) ve içinde (3, 7, 8 ve 9) bulunan TLR'ler özgün PAMP'larını tanır ve TLR sinyal basamaklarını etkinleştirirler (Monlish ve ark., 2016).....	56
Şekil 4.1. U266 hücrelerinde (5000 hücre/kuyu) normal kültür koşullarında Karfilzomib, İksazomib ve Venetoklaks inhibitörleriyle 24 saat inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları *; $p<0.05$	76
Şekil 4.2. RPMI 8226 hücrelerinde (5000 hücre/kuyu) normal kültür koşullarında Karfilzomib, İksazomib ve Venetoklaks inhibitörleriyle 24 saat inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları *; $p<0.05$	76
Şekil 4.3. NCI H929 hücrelerinde (5000 hücre/kuyu) normal kültür koşullarında Karfilzomib, İksazomib ve Venetoklaks inhibitörleriyle 24 saat inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları *; $p<0.05$	76
Şekil 4.4: U266, RPMI 8226 ve NCI H929 hücre hatlarında normal kültür koşullarında <i>BCL2</i> , <i>BCLXL</i> , <i>CASP3</i> , <i>IRAK4</i> , <i>MCL1</i> , <i>MyD88</i> , <i>TRAF6</i> ve <i>GAPDH</i> genlerine ait erime eğrileri. A) U266, B) RPMI 8226, C) NCI H929. Genlerin Melting Curve analizine ait sıcaklık dereceleri yatay eksen, floresan sinyalleri dikey eksen yer almaktadır.....	80
Şekil 4.5: U266 RPMI 8226 ve NCI H929 hücre hatlarında Pam ₃ CSK ₄ stimülasyonlu kültür koşullarında kontrol kültüründe <i>BCL2</i> , <i>BCLXL</i> , <i>CASP3</i> , <i>IRAK4</i> , <i>MCL1</i> , <i>MyD88</i> , <i>TRAF6</i> ve <i>GAPDH</i> genlerine ait erime eğrileri. A) U266, B) RPMI 8226, C) NCI H929. Genlerin Melting Curve analizine ait sıcaklık dereceleri yatay eksen, floresan sinyalleri dikey eksen yer almaktadır.	81
Şekil 4.6: U266 hücrelerinde normal ve Pam ₃ CSK ₄ stimülasyonlu kültür koşullarında Karfilzomib, İksazomib ve Venetoklaks inhibitörlerinin tekil ve kombine uygulamalarının apoptoz ile ilişkili biyokimyasal belirteçler üzerindeki etkisi. Hücrelerde 24 saatlik kültürden hazırlanan toplam hücre lizatlarında Kaspaz 3, aktif Kaspaz 3, Bid ve aktif Bid proteinlerinin western blot ve rölatif değerleri ölçüldü. Yükleme kontrolü olarak β -aktin kullanıldı. A) Hücrelerin western blot analizinde elde edilen protein	

ekspresyon görüntüleri. B) Bid ve aktif Bid proteinlerinin Image J analizinde elde edilen rölatif değerleri. C) Kaspaz 3, aktif Kaspaz 3 proteinlerinin Image J analizinde elde edilen rölatif değerleri. Veriler, üç gözlemin ortalamasını temsil etmektedir. '*' Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı; '#', Gruplar arası eşlenikleri ile karşılaştırıldığında anlamlı (Kruskal Wallis Testi, $p < 0.05$).....94

Şekil 4.7: RPMI 8226 hücrelerinde normal ve Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında Karfilzomib, İksazomib ve Venetoklaks inhibitörlerinin tekil ve kombine uygulamalarının apoptoz ile ilişkili biyokimyasal belirteçler üzerindeki etkisi. Hücrelerde 24 saatlik kültürden hazırlanan toplam hücre lizatlarında Kaspaz 3, Aktif Kaspaz 3, Bid ve Aktif Bid proteinlerinin western blot ve rölatif değerleri ölçüldü. Yükleme kontrolü olarak β -aktin kullanıldı. A) Hücrelerin western blot analizinde elde edilen protein ekspresyon görüntüleri. B) Bid ve Aktif Bid proteinlerinin Image J analizinde elde edilen rölatif değerleri. C) Kaspaz 3, Aktif Kaspaz 3 proteinlerinin Image J analizinde elde edilen rölatif değerleri. Veriler, üç gözlemin ortalamasını temsil etmektedir. '*' Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı; '#', Gruplar arası eşlenikleri ile karşılaştırıldığında anlamlı (Kruskal Wallis Testi, $p < 0.05$).....95

Şekil 4.8: NCI H929 hücrelerinde normal ve Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında Karfilzomib, İksazomib ve Venetoklaks inhibitörlerinin tekil ve kombine uygulamalarının apoptoz ile ilişkili biyokimyasal belirteçler üzerindeki etkisi. Hücrelerde 24 saatlik kültürden hazırlanan toplam hücre lizatlarında Kaspaz 3, Aktif Kaspaz 3, Bid ve Aktif Bid proteinlerinin western blot ve rölatif değerleri ölçüldü. Yükleme kontrolü olarak β -aktin kullanıldı. A) Hücrelerin western blot analizinde elde edilen protein ekspresyon görüntüleri. B) Bid ve Aktif Bid proteinlerinin Image J analizinde elde edilen rölatif değerleri. C) Kaspaz 3, Aktif Kaspaz 3 proteinlerinin Image J analizinde elde edilen rölatif değerleri. Veriler, üç gözlemin ortalamasını temsil etmektedir. '*' Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı; '#', Gruplar arası eşlenikleri ile karşılaştırıldığında anlamlı (Kruskal Wallis Testi, $p < 0.05$).....96

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Multipl miyelom (MM), genellikle 50 yaş üzerindeki bireylerin kemik iliğinde malign plazma hücrelerinin klonal çoğalmasıyla karakterize bir B hücre neoplazisidir (Cho ve ark., 2014). Hastalarda Non-Hodgkin lenfomadan sonra ikinci en sık görülen hematolojik malignite olup tüm malignitelerin %1'ini oluşturmaktadır. Tedavi sürecinde hastalara otolog veya allojenik kemik iliği transplantasyonu gerçekleştirilmektedir (Dehghanifard ve ark., 2018). Hastalık heterojenliği nedeniyle tedavide tümör hücrelerinde farklı sinyal yollarını hedefleyen birçok farklı ajan kullanılmaktadır (Astakhova ve ark., 2018). Zamanla ilaca dirençli tümör hücreleri ortaya çıkmakta ve hastalık ancak belirli süre kontrol altında tutulabilmektedir. Bu süreçte proteozom inhibitörü Bortezomib (BTZ) en etkili ve yaygın olarak kullanılan ajandır. Günümüzde BTZ'ye yönelik dirençlilik ve tedavi yanıt sürelerinin iyileştirilmesi için yeni nesil proteozom inhibitörleri geliştirilmiştir (Kuhn ve ark., 2007).

MM'nin patogeneze ve ilaç dirençliliğinde kemik iliği mikroçevresi kritik rol oynamaktadır (Dehghanifard ve ark., 2018). Söz konusu ortamda MM hücreleri çeşitli hücrelerle etkileşime girerek iskelet yıkımı ve anjiyogeneze sağlamaktadır. Böylelikle hücre proliferasyonunda artış, büyüme faktörlerinin salgılanması ve adezyon moleküllerinin düzenlenmesiyle hastalığın progresyonu ve tedaviye dirençlilik gelişmektedir (Cho ve ark., 2014). Ayrıca, MM hastalarında bakteriyel, fungal ve viral enfeksiyonlara karşı savunma yetersizdir ve tekrarlayan enfeksiyonlar ölüm nedeni olmaktadır. Söz konusu enfeksiyonların hastalık patolojisine katkısı araştırılmıştır (Jego ve ark., 2016; Bao ve ark., 2011). Buna göre Abdi ve ark. (2011), araştırmalarında MM hücrelerindeki Toll Like Reseptörlerin (Toll Like Receptor, TLR) varlığına dikkat çekmiştir. Bu çalışmada tekrarlayan enfeksiyonlarda mikroorganizmalardaki patojenle ilişkili moleküler paternlerin (pathogen associated molecular patterns, PAMP) TLR stimülasyonu aracılığıyla MM patolojisiyle ilişkili olabileceğini bildirilmiştir. Nitekim, TLR sinyal yolağının farklı kanser hücrelerinde çoğalmayı, metastazı ve anjiyogenezi desteklediği gösterilmiştir (Lee ve ark., 2014).

TLR'ler hücrel hasar ve patojenle ilişkili moleküler paternleri algılayan reseptörler olarak organizmanın bağışıklık sisteminde görevlidir. Hücrede TLR sinyal yolağının aktivasyonu ile transkripsiyon faktörleri uyarılmaktadır. Bu transkripsiyon faktörleri bağışıklık hücrelerinin etkinleştirilmesi için gerekli olan proinflatuar sitokinleri ve kostimulatör molekülleri indüklemektedir (Lee ve ark., 2014). MM hücrelerinin de köken aldığı B hücrelerinde birçok TLR ekspresyonu mevcut olup stimülasyonları genellikle proliferasyona, hücre farklılaşmasına ve apoptoz önleyici etkilere aracılık etmektedir (Bohnhorst ve ark., 2006). Bu bağlamda tekrarlayan enfeksiyonların TLR'ler aracılığıyla MM hücreleri ile ilişkili olması muhtemeldir. Diğer taraftan, son yıllarda MM hücrelerinin biyolojisinde çeşitli TLR sinyallerinin rolüne odaklanılmıştır. Literatürde TLR agonist ve antagonistlerinin MM hücreleri üzerinde etkisine yönelik birçok çalışma mevcuttur (Kanzler ve ark., 2007; Ray ve ark., 2014; Lee ve ark., 2018; Weir ve ark., 2018). Bunlardan öne çıkan bir örnek TLR1/2 sinyalizasyonunun kemoterapotik ajanın apoptotik gücünü desteklemesine yöneliktir. TLR1/2 stimülasyonunun MM hücrelerinin hayatta kalma ve ilaç dirençliliğine etkisine yönelik inceleme yapan Abdi ve ark. (2013), uyarımın MM hücrelerinde adezyonu etkilediğini ve BTZ ile kombinasyonunun hücre apoptozunu arttırdığını göstermiştir. Aynı araştırma grubunun 2014 yılında yaptıkları çalışmada, kemik iliğinin enflamatuar ortamında MM hücrelerinin TLR'ler aracılığıyla mikrobiyal/endojen ligandlar tarafından aktive edilebileceği gösterilmiştir. Böylelikle TLR1/2 aktivasyonunun miyelom hücrelerinde integrin ailesi molekülleriyle kemik iliği stromal hücreleri (Bone Marrow Stromal Cells, BMSC) etkileşimlerini sağladığı ve böylece BTZ sitotoksitesinin arttırılmasında rolü olduğu gösterilmiştir (Abdi ve ark., 2014).

MM tedavisinde başarının arttırılmasına yönelik araştırmalar devam etmektedir. En önemli araştırma alanlarından birisi BTZ'nin yeni jenerasyonlarının üretilmesidir. Yeni ajanlarda daha etkili proteozom inhibisyonu, geri dönüşümsüz bağlanma, inaktif formda sentezlenen ajanın oral kullanıma uyarlanması hedeflemektedir (Astakhova ve ark., 2018). Ayrıca BTZ ve yeni nesil proteozom inhibitörlerinin (Proteasome Inhibitor, PI) farklı ajanlarla kombinasyonlar halinde kullanımının hücrel yanıtı olumlu etkilediği

gösterilmiştir (Dimopoulos ve ark., 2018). Günümüzde yeni ve farklı altyapılardan bileşenlerin kombinasyon incelemeleri devam etmektedir.

Tez çalışmamızda, MM hücrelerinin enflamatuvar ortamda mikrobiyal/endojen ligandlar tarafından aktive edilebileceği hipotezine dayanarak TLR uyarımı ile MM hücrelerinin hayatta kalması ve ilaca yanıtının modüle edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışmamızda MM hücre hatlarında heterodimerik TLR1/2 reseptörünü uyararak Pam₃CSK₄ agonistini kullanarak yeni nesil kemoterapi ilaçları Karfilzomib (CFZ), İksazomib (IXS) ve Venetoklaks (VNT) ile malignite ve hücre proliferasyonuna etkisi incelenmiştir.

MM hücrelerinde Pam₃CSK₄ agonisti aracılığıyla TLR1/2 reseptör stimülasyonu sağlanmaktadır. Ligand bağlanması sonrasında TLR sinyal yolağında görevli adaptör proteinler kullanılarak aktivasyon gerçekleştirilmektedir (Monlish ve ark., 2016). Çalışmamızda TLR sinyal yolunun kullanılma etkinliği MyD88, IRAK4 ve TRAF6 genlerinin mesajcı RNA (messenger RNA, mRNA) düzeyindeki değişimleriyle incelenmiştir.

TLR1/2 reseptör stimülasyonu aracılığıyla hücrede yanıt olarak Nükleer Faktör Kappa B (NFκB) transkripsiyon faktörü aktive edilmektedir (Eriksson ve ark., 2017). NFκB, MM tümör progresyonu düzenleyen ve mikroçevresinde hücre canlılığını yönlendiren temel bileşenlerdendir (Gilmore, 2007). Söz konusu etkiyi, MM hücrelerinde apoptozun engellenmesi için anti-apoptotik proteinlerde ((B hücreli lenfoma 2, (B-cell lymphoma 2, BCL2), B hücreli lenfoma-ekstra büyük (B-cell lymphoma-extra large, BCLXL) ve miyeloid lösemi hücre farklılaşma proteini (myeloid leukemia cell differentiation protein, MCL1)) artışı tetikleyerek sağlamaktadır (Shah ve Orlowski, 2009; Seiller ve ark., 2020). Çalışmamızda anti-apoptotik proteinler üzerindeki etki BCL2, BCLXL ve MCL1 proteinlerini kodlayan genlerin mRNA düzeyindeki değişimleriyle incelenmiştir.

MM tedavisinde kullanılan Pİ'ler hücre ölümünü endoplazmik retikulum (ER) stresini indükleyerek ve miyelomagenezde kritik öneme sahip transkripsiyon faktörü NFκB aktivasyonunu baskılayarak tetiklemektedir (Hungria ve ark., 2019; Ito, 2020).

Çalışmamızda hücre ölümü apoptoz ortak efektörü Kaspaz-3'ün mRNA ve protein düzeyindeki değişimleriyle incelenmiştir.

TLR1/2 reseptör stimülasyonu hücrede apoptozla ilişkilendirilmektedir (Salaun ve ark., 2006). Ligandla uyarılma sonrasında pro-apoptotik yanıt Fas/Apo-1 ilişkili ölüm domain (Fas/Apo-1-associated death domain, FADD) üzerinden gelişmektedir. FADD'ın etkinliğiyle hücrede zimojenler proteoliz ile aktif enzimlere dönüşmektedir. Aktifleşen hücresel bileşenlerde apoptotik programı yürütmektedir (Aliprantis ve ark., 2000). Bu süreçte Bid proteininin aktivasyonu translasyon sonrası aktivasyonun özgün bir göstergesidir (Lomonosova ve Chinnadurai, 2008). Çalışmamızda FADD ilişkili hücre apoptozu Bid'in protein düzeyindeki değişimiyle incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Multiple Miyeloma

2.1.1. Tanımı

MM, genellikle düşük proliferasyonlu plazma hücrelerinin oluşturduğu farklılaşmasını tamamlamış B hücreli klonal bir tümör prototipidir (Donk ve ark., 2005; Scalzulli ve ark., 2018). Hastalık kemik iliğinde gözlenir. Sıklıkla monoklonal protein üretimiyle karakterizedir (Hoffman, 2009). Tümör tiplendirmesi ve hastalığa cevapta çeşitlilik gözlenir. Bunlar arasında: böbrek yetmezliği, enfeksiyona duyarlılık, anemi, hiperkalsemi, pıhtılaşma düzensizlikleri, hipervizkozite bulguları, nörolojik semptomlar, organ fonksiyon bozuklukları, kemik ağrıları veya kırık semptomları bulunmaktadır (Longo ve Harrison, 2010).

2.1.2. Epidemiyoloji

MM, malign hastalıkların yaklaşık %1'ini ve hematolojik malignitelerin %10'nunu oluşturur. Yıllık insidansı 100.000'de 3-4'tür. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) her yıl tahminen 14.000 yeni miyelom vakası teşhis edilmekte ve her yıl yaklaşık 13.000 hasta ölmektedir (Hoffman, 2009). Genellikle klonal plazma hücre proliferasyonunun asemptomatik premalign safhasından gelişir. Bu hücre çoğalması “önemi saptanmamış monoklonal gammopati” (monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS) olarak tanımlanır. MGUS, 50 yaş ve üzeri popülasyonun %3'ünden fazlasında mevcuttur ve yılda %1 oranında miyeloma veya ilişkili malignensiye ilerler. Hastalık başlangıcı 40-70 yaşlar arasındadır. Çocuk ve 30 yaş altı yetişkinlerde gözlenmez (Turgeon, 2012). Tanıda ortalama yaş erkeklerde 69, kadınlarda 71'dir ve hastaların %5'inden azı 40 yaşından küçüktür. 30 yaş altındaki bireylerde görülebilmemesine rağmen, non-Hodgkin lenfoma veya metastatik malignite gibi diğer monoklonal gamopati veya litik lezyonların eliminasyonu gereklidir. MM insidansı Afrika kökenli bireyler ve erkekler arasında daha yüksektir. Afrika kökenli erkeklerde yaklaşık yılda 100.000'de 9 ve kadınlarda 6 iken, Kafkas kökenli erkeklerde 4 ve kadınlarda 3'tür. ABD'deki beyazlarla karşılaştırıldığında Hawaii'liler, İspanyollar, Kızılderililer ve Alaska Yerlileri

daha yüksek miyelom oranlarına sahiptir. Asya kökenli bireyler Kafkas kökenli bireylerle karşılaştırıldığında daha düşük miyelom insidansına sahiptir (Hoffman, 2009). Ülkemizde ise yılda yaklaşık olarak 7.500 bireyin hastalık tanısı aldığı, 3.000 kişinin ise hayatını kaybettiği öngörülmektedir (Thd, 2020).

2.1.3. Patogenez

MM hücreleri, BMSC'lere ve hücre dışı matrisine (Extra Cellular Matriks, ECM) hücre yüzey adezyon molekülleriyle bağlanmaktadır. Bu etkileşim MM hücre büyümesini, hayatta kalmasını, ilaca direncini ve kemik iliği ortamında göçünü tetikler (Longo ve Harrison, 2010). Malignant plazma hücrelerinin orjini tam olarak bilinmemekle birlikte kemik iliği plazma hücrelerine aynı klonal immünoglobulin (Ig) gen yeniden düzenlemelerine sahiptir. Miyelom hücrelerinde Ig sentezinde görevli ağır zincir değişken bölgelerini (Variable heavy chain, V_H) kodlayan genlerde yapılan incelemeler, MM'deki malign klonun B-hücre gelişiminin geç safhasından oluştuğunu göstermiştir. Ayrıca zincirdeki çoklu somatik mutasyonlar intra klonal çeşitlilik göstermeyen belirli bir antijene özgü hücre karakteristiği göstermiştir. Bu nedenle, miyelomun köken aldığı hücre büyük olasılıkla B bellek hücresi veya bir plazma blastıdır (Hoffman, 2009).

2.1.4. Klinik Özellikler

Genel MM semptomları hastaların üçte ikisinde mevcuttur. Bunlar kemik ağrısı (tipik olarak sırt veya göğüs), zayıflık ve halsizliktir. Hastalık ilerledikçe kilo kaybı ve gece terlemeleri ortaya çıkar. Bazı hastalarda düzensiz kanama belirleyicidir. Ayrıca hiperviskozite, trombositopeni, hipogamaglobulinemi, akut enfeksiyon, böbrek yetmezliği, hiperkalsemi veya amiloidoz ana semptomlar arasındadır. Hastaların yaklaşık %90'ında yaygın iskelet hasarı ve kemik iliği muayene sonuçları belirleyicidir (Turgeon, 2012). MM'nin çeşitli klinik özellikleri Tablo 2.1'de özetlenmektedir. Zayıflık, enfeksiyon, kanama ve kilo kaybı, hastaların sırasıyla %82, %13, %13 ve %24'ünde görülür. Hiperkalsemi, hastaların %18-30'unda bulunur. Hastaların %1'inden daha azında “tümör ateşi” mevcuttur (Greer ve ark., 2018). MM hastaların %20'si rutin kan testleriyle asemptomatik evrede teşhis edilir. Semptomlar ayrıca para-proteinlerin organlarda birikmesi veya miyelom hücreleri tarafından üretilen İnterlökin 6 (IL-6), Vasküler

Endotelial Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) gibi sitokinlerle ilişkili olabilir (Hoffman, 2018). MM progresif olup, çoğu hasta 1-3 yıl içinde kaybedilir. Ölüm nedenleri enfeksiyon ve böbrek yetmezliğidir. İmmün sistemi baskılanma durumuna çeşitli faktörler katkıda bulunur (Turgeon, 2012). Düzensiz Ig üretimi, normal Ig sentezinde oransal azalmaya ve katabolizmasında artışa neden olur. Diğer taraftan Ig yapılanmasındaki hafif ve ağır zincir koordinasyonu da bozulur. Ağır zincir bağlantısı yapılmayan hafif zincir formu dolaşıma katılır ve “Bence Jones Proteini” olarak ifade edilir (Greer ve ark., 2018). Tümör yükü arttıkça, antikor yanıtı daha çok bozulur ve humoral immünoşüpresyon derecesi yükselir. MM’li hastalarda kompleman aktivitesi de eksiktir. Hastalık ilerledikçe, kemik iliği yetmezliği sonucu granülositopeni gelişebilir (Turgeon, 2012).

M proteini (M bileşeni, miyelom proteini veya M piki) hastalığın ayırt edici özelliğidir. MM hastalarının %97'sinde protein elektroforezi, immünoelektroforez veya serum/ıdrarın immünofiksasyon çalışmaları ile tespit edilebilen bozulmamış Ig veya serbest bir Ig hafif zinciri bulunur. Ig içermeyen vakalar yaklaşık %1-3 olup sekretuar olmayan MM olarak adlandırılır (Greer ve ark., 2018). Hastalarda, osteoklastik ve osteoblastik aktivite dengesi bozulmaktadır. Kemik ağrısı, hastaların yaklaşık %70'ini etkileyen genel bir semptomdur. Metastatik karsinom ağrısından farklı olup, genellikle sırt ve kaburgalarda gözlenir. Lokalize ağrı büyük ölçüde patolojik kırıkla ilişkilidir. Kemik lezyonları tümör hücrelerinin proliferasyonundan kaynaklanır. Çünkü aktifleşen osteoklastlar kemiği parçalar ve yeni kemik oluşturan osteoblastları baskılar (Longo ve Harrison, 2010). Bazı vakalarda kemik lezyonlarından önce, artan osteoklast jenerasyonuna bağlı osteoblastik oluşum gözlenir (Greer ve ark., 2018). Hiperkalsemi MM hastalarının %18-30'unda görülür ve yaklaşık %13'ü 11 mg/dl'den daha yüksek konsantrasyondadır. Günümüzde erken teşhis nedeniyle hiperkalsemi oranı azalmaktadır. Hiperkalsemik hastalarda sık gözlenen şikayetler arasında yorgunluk, kabızlık, bulantı ve bilinç karışıklığı bulunmaktadır. Kalsiyumun böbreklerde presibite olması ve böbrek yetmezliğini arttırması muhtemeldir (Greer ve ark., 2018).

Hastaların yaklaşık %25'inde böbrek yetmezliği ve tanıda 2 mg/dl'den yüksek serum kreatinin değeri mevcuttur (Greer ve ark., 2018). Böbrek yetmezliği nedenleri arasında

antienflamatuar kullanımı, tekrarlayan enfeksiyonlar, hiperkalsemi, miyelom infiltrasyonu, glomerüler amiloid ve hiperürisemi birikimi gösterilebilir. Bence Jones sekresyonu olan hastalarda, tübüler hasarlı böbrek yetmezliği görülür. Normalde, hafif zincirler tübüllerde filtrelenir, geri alınır ve katabolize edilir. Ancak hafif zincirin dolaşımında artan miktarı, tübülleri aşırı yükleyerek hasar oluşturur (Longo ve Harrison, 2010). MM hastalarında patolojik böbrek lezyonu tübüllerde yoğun, sıklıkla lamine formda albümin içeren monoklonal hafif zincirlerin birikmesidir. Bu yüzden birikim ve böbrek yetmezliği arasında korelasyon vardır (Greer ve ark., 2018). Hastaların yaklaşık %80'inde anemi görülür. %40-73'ünde hemoglobin konsantrasyonu 120 g/L'nin altında olup, zayıflık ve yorgunluğa katkıda bulunur. Genellikle normositik ve normokromiktir ancak makrositoz da görülebilir. Serum Ig yüksek konsantrasyonlarda olduğunda rulo formasyonu gözlenebilir. Anemi ve hiper proteinemi kombinasyonu, vakaların %90'dan fazlasında eritrosit sedimentasyon hızında belirgin bir artışa neden olur. Hemolizin anemiye katkısıyla folat veya B12 eksikliği gözlenir. Tümör infiltrasyonu ve sağlıklı kemik iliğinin kaybıyla hematopoezin inhibisyonu gelişir (Turgeon, 2012). Ayrıca miyeloma proliferasyonuna kaynaklık eden kemik iliği sitokin ortamı ve eritropoez problemleri gelişir. Çünkü mikroçevrede artan tümör nekroz faktörü α (Tumor necrosis factor α , TNF- α) ve interlökin 1 (IL-1) gibi sitokinler eritropoezi inhibe etmektedir (Greer ve ark., 2018). MM hastalarında bir diğer klinik problem bakteriyel enfeksiyonlara yatkınlıktır. Başlangıç evresinde, *Streptococcus pneumoniae* ve *Haemophilus influenzae* gibi kapsüllenmiş organizmalarla enfeksiyonlar yaygındır. Sık gözlenen enfeksiyonlar pnömoni ve piyelonefrittir. Sık görülen patojenler akciğerlerde; *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, idrar yolunda; *Escherichia coli* ve diğer gram-negatif mikroorganizmalardır. Gram-negatif basiller, *Streptococcus pneumoniae*'den daha yaygın gözlenir. Tekrarlayan enfeksiyon hastaların %25'inde karakteristiktir ve %75'inin anemnezinde atlatılmış ciddi enfeksiyon vardır (Turgeon, 2012). Enfeksiyon için risk göstergeleri olarak serum kreatinin değeri 2 mg/dl veya daha yüksek olması, poliklonal serum Ig seviyelerinin azalmasıdır. Tanıdan sonra, gram-negatif basiller ve *Staphylococcus aureus*'a bağlı enfeksiyon oranı belirgin şekilde artar ve enfeksiyona bağlı ölümlerin %90'dan fazlasını oluşturur (Greer ve ark., 2018).

Tablo 2.1: Multipl miyelomun klinik özellikleri (Greer ve ark., 2018; Turgeon, 2012).

Klinik Özellik	Klinik Bulgu	Nedeni ve Patolojik Mekanizma
Kemik Yıkımı	- Hiperkalsemi - Osteoporoz - Kemik ağrıları - Litik kemik lezyonları - Patolojik kırıklar - Omurilik sıkışması - Sinir kökü ağrısı	- Tümör ekspansiyonu - Tümör hücreleri tarafından osteoklast aktive edici faktör üretimi - Osteoblast inhibitör faktörler
Nörolojik semptomlar	- Nefes darlığı - Geçici iskemik ataklar - Derin ven trombozu - Retinal hemoraj - Epistaksis - Poliüri, Polidipsi - Bulantı, kusma - Raynaud fenomeni - Akrosiyanoz	- Hiperviskozite - Kriyoglobulinemi - Amiloid birikintileri - Hiperkalsemi - Sinir kompresyonu - Anti-nöronal antikor - POEMS sendromu - Tedaviye bağlı toksisite
Böbrek yetmezliği	- Bulantı - Kusma - Kırgınlık - Halsizlik - Periferik nöropati - Bağımlı ödem - Organomegali	- Hiperkalsemi - Hafif zincir birikimi - Amiloidoz - Ürat nefropati - İlaç toksisitesi (steroid olmayan antienflamatuar ajanlar, bifosfonatlar) - Kontrast boya kullanımı
Kanama eğilimi	Kemik iliği İnfiltrasyonu	- Pıhtılaşma faktörleriyle etkileşim - Pıhtılaşma faktörlerine karşı antikor - Endotelyumun amiloid hasarı - Trombosit fonksiyon bozukluğu - Trombosit antikor kaplaması - Tedaviye bağlı hiper pıhtılaşma kusurları
Azalmış Globulin	- Tekrarlayan enfeksiyonlar - Zatürre	- Hipogamaglobulinemi - Düşük CD4 sayısı - Azalmış nötrofil göçü
Yorgunluk	Anemi	- Kemik iliği infiltrasyonu - İnhibitör faktörlerin üretimi - Hemoliz - Azalmış kırmızı hücre üretimi - Azalmış eritropoietin seviyeleri

2.1.5. Teşhis ve Evreleme

MM hastalarında teşhis, tedavi stratejisine karar verme açısından belirleyicidir. Prognoz, bireysel özellikler, hastalık evresi ve tedaviye yanıtta etkilenmektedir (Oliver ve ark., 2018; Dimopoulos ve ark., 2018). MM, Uluslararası Evreleme Sistemi (International Staging System, ISS) ile sınıflandırılmaktadır. ISS, albümin ve β_2 -microglobulin'i (β_2M) değerlendirmektedir (Dimopoulos ve ark., 2018). β_2M , tümör kütle ve böbrek fonksiyon bozukluğu ile ilişkili olup, düşük albümin MM hücrelerinin IL-6 üretimini yansıtır (Oliver ve ark., 2018). Evreleme sistemlerinin dezavantajı, tüm bulguları kapsamamasıdır. Bu nedenle, Uluslararası Miyeloma Çalışma Grubu (International Myeloma Working Group, IMWG) düzenlediği Revize Uluslararası Evreleme Sistemi (Revised International Staging System, RISS) benimsenmiştir (Tablo 2.2) (Dimopoulos ve ark., 2018). RISS, yüksek riskli sitogenetik düzensizlikler veya yüksek laktat dehidrojenaz seviyesi varlığı gibi güncel MM biyolojisi belirleyicilerini 3 evreli ISS'ye dahil eder (Dimopoulos ve ark., 2018).

Tablo 2.2: MM'da uluslararası evreleme sistemleri (Dimopoulos ve ark., 2018; Oliver ve ark., 2018).

Uluslararası Evreleme Sistemi		Revize Uluslararası Evreleme Sistemi
Evre I	β_2-microglobulin <3.5 - Albümin ≥ 3.5	β_2-microglobulin <3.5 - Albümin >3.5 - Riskli sitogenetik bulgu olmaması - Normal LDH düzeyi - Hasta oranı %28 5-yıllık sağ kalım oranı %82
Evre II	β_2-microglobulin <3.5 - Albümin <3.5 β_2-microglobulin $3.5-5.5$	- Evre I ve Evre III dışında olanlar - Hasta oranı %62 5-yıllık sağ kalım oranı %62
Evre III	β_2-microglobulin >5.5	β_2-microglobulin >5.5 - Artmış LDH düzeyi - Riskli sitogenetik bulgu olması - t(4;14), t(14;16), del(17p) - Hasta oranı %10 5-yıllık sağ kalım oranı %40

2.1.6. Prognoz

MM'da hayatta kalma oranı son 15 yılda önemli ölçüde artmıştır (Hungria ve ark., 2019). Prognoz hastaya (yaş, performans durumu, böbrek fonksiyonu ve zayıflık), tümörle ilişkili faktörlere ve bu faktörler arasındaki etkileşime bağlıdır. Hastalık heterojenitesi ve çeşitli bulgular göz önüne alındığında bireye özgü prognostik faktörlerin anlaşılması ve risk derecelendirme sistemlerinin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Ayrıca yeni terapötik stratejilerinin geliştirilmesi de bu süreci yönlendirmektedir (Greer ve ark., 2018). İleri yaş ve yetersiz performans iki bağımsız prognostik faktör olup hastaların %20'sinin 2 yıldan az %40'tan fazlasının 10 yıldan fazla sağkalımı vardır (Hoffman, 2018).

MM'de etkili terapötik müdahale için hastalık risk sınıflandırması kritik öneme sahiptir (Mohty ve Harousseau, 2015). Günümüzde kullanılan RISS Sistemi sitogenetik/FISH değişiklikleri, genomik korelasyonları, serum albümin ve β 2-mikroglobulin seviyelerini esas almaktadır. Bunlardan β 2M konsantrasyonu oldukça güvenilir bir prognostik faktördür. Çünkü hem tümör yükünden hem de böbrek fonksiyonundan etkilenmektedir (Greer ve ark., 2018; Hoffman, 2018). Ayrıca yakın dönemde MM hücre kinetiğini, sinyalizasyonunu, genetik düzensizlikleri ve apoptozu yansıtan yeni sistemler kullanıma girmiştir (Greer ve ark., 2018).

2.1.7. Tedavi Yöntemleri

1999'dan önce MM'ye karşı kullanılan ajanlar bifonksiyonel alkilleyiciler, nitrosourealar, doksorubisin ve glukokortikoidlerdi. Bu ilaçlar 1960'lardan itibaren vinkristin ile birlikte tek başına veya kombinasyon halinde kemoterapinin temelini oluşturuyordu. Sonrasında geliştirilen otolog ve allojenik kök hücre transplantasyonu önemli terapötik seçenekler olmuştur. 1999 yılında MM için Talidomid aktivitesinin tanımlanması ve devamında BTZ, Lenalidomid (LLD), CFZ, Pomalidomide (PMD), IXS, Daratumumab (DTB), Elotuzumab (ETB) ve Panobinostat'ın (PBT) geliştirilmesi ile tedavi başarısı önemli ölçüde değişmiştir (Greer, 2014).

MM için tedaviye başlamadan önce, asemptomatik MM (smoldering) ile aktif MM arasında ayırım yapılmalıdır. MM hastalarının yaklaşık %20'si semptomların belirsiz

olduğu evrede saptanır ve bu hastalar tedaviye başlamadan takip edilebilir. Tedavi sürecinde uzun vadeli bir plan hazırlanmalıdır (Greer, 2014; Gulla ve Anderson, 2020).

Semptomatik MM'li hastalar tedavi gerektirir. İlk tedavi süreci hastanın yaş, performans ve mevcut komorbiditelere göre belirlenen yüksek doz tedavi (high dose treatment, HDT) ve otolog kök hücre nakli tedavisi (autologous hematopoietic stem cell transplantation, ASCT) uygunluğuna bağlıdır. 65 yaştan küçük tüm hastalar, nakil uygunluğu açısından değerlendirilmelidir (Moehler ve Goldschmidt, 2011). Günümüzde komorbiditeleri olmayan 70 yaşından küçük hastaları için en uygun tedavi yöntemi yüksek dozterapi sonrası ASCT'dir. Bu hastalar için başlangıç tedavisi tipik olarak dört aşamaya ayrılabilir: indüksiyon tedavisi, HDT, ASCT, konsolidasyon ve devam tedavisidir (Greer, 2014; Mohty ve Harousseau, 2015).

2.1.8. Proteozom İnhibitörleri ve Multiple Miyeloma Tedavisindeki Önemi

Proteozom inhibitörleri (PI) hücredeki proteolitik fonksiyonları araştırmak için geliştirilmiştir (Shah ve Orlowski, 2009). Başlangıçta protein dönüşümündeki rolleriyle kanser hastalarındaki zayıflamayı önlemek için kullanımı hedeflenmiştir. Ancak *in vitro* ve *in vivo* tümör modellerinde apoptozu indüklemeleriyle terapötik potansiyelleri öne çıkmıştır (Scalzulli ve ark., 2018). Günümüzde MM tedavisi için etkili terapötiklerdir. İlk onaylanan Pİ bileşiği BTZ olup MM'in tüm evrelerinde kullanılmaktadır. Kliniğe girdiği 2003 yılından itibaren hastaların hayatta kalma oranını önemli ölçüde arttırmıştır (Dou ve Zonder, 2014).

Proteozom multikatalitik proteazlardan oluşan büyük protein kompleksidir ve proteinlerin işlenmesinden sorumludur. Hücrede apoptoz, sağkalım, hücre döngüsü, DNA onarımı ve antijen sunumu gibi süreçlerde görev alır (Dou ve Zonder, 2014). Hücrelerin çekirdeğinde ve sitoplazmasında Ubikitin proteozom yolunda (ubiquitin-proteasome pathway, UPP) faaliyet gösterir. UPP sisteminde proteinler ubikitinle işaretlenir ve proteozom kompleksi tarafından küçük peptitlere indirgenerek parçalanır (Hungria ve ark., 2019). Proteozom yapısı 26S (Svedberg birimi) büyüklüğünde olup 19S'lik alt birimi tanıma, 20S alt birimi parçalama işlevi görür. Proteolitik aktivitesinde, proteinleri sırasıyla asidik, bazik, dallı zincirli, hidrofobik ve küçük nötr amino asitlere

bölerek önce oligopeptidler sonra amino asitler üretir (Shah ve Orlowski, 2009). Aktif proteolitik bölge 20S'lik alt birimde 28 protein içeren 4 homolog halkadan oluşmaktadır. Halkaların 2'si yedi α alt biriminden, diğer 2'si ikisi yedi β alt birime sahiptir. Enzimatik aktivite 3 β alt birimde (β 1kaspaz benzeri, β 2 tripsin benzeri ve β 5kimotripsin benzeri), gerçekleşmektedir. Pİ'ler hücredeki proteozomları bu 3 katalitik bölge üzerinden hedef almakta ve faaliyetlerini inhibe etmektedir (Ito, 2020). Ayrıca, proteozomun alternatif bir formu hematopoietik hücrelerde immünoproteozom olarak yüksek oranda eksprese edilmekte ve Pİ'ler tarafından hedeflenmektedir (Dou ve Zonder, 2014).

Hücresin Pİ duyarlılığı, sahip olduğu proteozom sayısı ve kapasitesi arasındaki farklılığa dayanmaktadır. Proteozom ihtiyacının fazla olduğu hücrede düşük proteozom aktivitesi poli-übikitillenmiş proteinlerin birikmesine neden olmaktadır. Bu durum proteozom stresine neden olarak hücre metabolizmasını ve kaderini etkilemektedir (Scalzulli ve ark., 2018). Neoplastik hücreler genellikle normal hücrelere kıyasla daha yüksek seviyede proteozom aktivitesine sahiptir. Böylelikle proteozom duyarlılığı onkolojide rasyonel bir terapötik hedef haline gelmiştir (Moreau ve ark., 2012). MM, seruma yüksek miktarda protein salgılanması ve salınması ile karakterize fizyopatolojik mekanizmaya sahiptir. Protein işleme kapasiteleri oldukça yüksek olduğu için yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinler ER'de birikerek ER stresi oluşturmaktadır. ER stresi, hatalı proteinlerin uzaklaştırılması için çeşitli hücresel sistemleri aktifleştirmektedir (Ito, 2020). ER ilişkili bozunma sistemi (ER-associated degradation, ERAD) bunlardan birisi olup yanlış katlanmış proteinlerin ubiquitinasyonla işaretlenmesi ve proteozomla parçalanması sürecini yürütmektedir. Dolayısıyla MM hücrelerinin canlılığında proteozomlar kritik öneme sahiptir. Pİ etkisiyle söz konusu proteinlerin birikmesi ve ER stresinin daha da artışı tetiklenmektedir. ER stresi hücre döngü düzeninin bozulmasına, apoptotik yolların aktivasyonuna ve buna bağlı hücre ölümüne neden olmaktadır (Hungria ve ark., 2019). Bunlara ek olarak, Pİ MM hücrelerinde miyelomagenез için gerekli olan transkripsiyon faktörü NF κ B aktivasyonunu da engellemektedir. Bunun için sitozoldeki NF κ B inhibitör molekölü I κ B'yi stabilize etmektedir. I κ B stabilizasyonu sonrasında NF κ B'nin nükleer translokasyonunun önlenmesiyle güçlü anti-miyelom etkisi üretilmektedir (Hungria ve ark., 2019). Çünkü NF κ B, MM gelişimi için tümör progresyonunda ve mikroçevresinde

önemli birçok faktörle ilişkilidir. Bunlar arasında fibronektin, IL-6, VEGF, hücre döngüsü düzenleyicileri (c-Myc ve siklin D1) ve anti-apoptotik araçlarla (BCL2 ve BCLXL) apoptozun engellenmesi bulunmaktadır (Shah ve Orlowski, 2009).

2.1.8.1. Bortezomib

BTZ, anti-miyelom etkileri olan ilk PI'dir. Yapısında boronik asit, pirazinoik asit, fenilalanin ve lösin içeren bir dipeptid boronik asit türevidir. 1995 yılında Myogenics tarafından geliştirilmiş, 1999'da Millennium Pharmaceuticals tarafından BTZ olarak klinik kullanıma girmiştir. FDA tarafından ABD'de 2003 yılında, EMA tarafından Avrupa'da 2004 yılında onaylanmıştır (Scalzulli ve ark., 2018). Proteozomu geri dönüşümlü ve seçici olarak inhibe etmektedir. Bunun için boronik asit grubu $\beta 5$ alt birimdeki treonin hidroksil grubunun aktif bölgesine bağlanarak kompleks oluşturur ve proteozomun kimotripsin benzeri aktivitesini engeller. Aynı zamanda $\beta 1$ alt birimine de düşük afinitede bağlanarak proteozomun kaspaz benzeri aktivitesini engeller (Dou ve Zonder, 2014). BTZ, tümör büyümesini, yayılmasını, anjiyogenezi ve hayatta kalma yollarını baskılayarak etki eder. MM'deki antitümör aktivitesinin mekanizmaları, *in vitro* ve *in vivo* deneylerle aydınlatılmıştır. Bunlardan bazıları şunlardır: i) MM hücrelerinde ve tümör mikroçevresinde NF κ B'nin aktivasyonunu inhibe eder. ii) MM hücrelerinin kemik iliği stromal hücrelerine tutunmasını azaltır. iii) MM hücrelerinde IL-6 üretimini ve hücre içi sinyalizasyonunu engeller. iv) Pro-anjiyojenik mediyatörlerin ekspresyonunu ve üretimi durdurur. v) BCL2 aşırı ekspresyonu ve tümör baskılayıcı p53'teki değişiklikler gibi apoptotik düzenleyicilerdeki kusurları giderir (Moreau ve ark., 2012). Ancak MM hastalarının BTZ ile tedavisinde solid tümörlerde yanıtızlık, inhibisyon özgülüğünün yetersizliğine bağlı toksisite ve dirençlilik gözlenmektedir. Bu yüzden terapiye yanıt oluşmamakta veya kısa süreli olabilmektedir (Dou ve Zonder, 2014). Hücre temelli çalışmalar dirençliliğin potansiyel mekanizmalarını göstermiştir. Bunlar: (i) BTZ'nin bağlandığı $\beta 5$ alt birimin aşırı ekspresyonu veya mutasyonu; (ii) BCL2 veya NF κ B gibi alt efektörlerinin aşırı ekspresyonu veya aktivasyonu; (iii) Pro-apoptotik protein düzeylerinde azalma, anti-apoptotik proteinlerin düzeylerinde artıştır (Dou ve Zonder, 2014; Scalzulli ve ark., 2018). Söz konusu problemleri çözmek için ikinci nesil proteozom inhibitörleri geliştirilmiştir. Bunların proteozom üzerinde daha iyi bağlanma

afinitesine, potansiyeline, geri dönüşümlü/dönüşümsüz bağlanmaya, seçiciliğe, kararlı kimyasal yapıya ve biyokimyasal özelliklere sahip olmaları hedeflenmiştir. İkinci nesil Pİ'ler kimyasal yapı ve aktif bölgelerine göre boronatlar, epoksik-ketonlar ve salino-sporamidler olarak 3 grupta sınıflandırılmaktadır (Moreau ve ark., 2012). Günümüzde özgün farmakolojik özellikleri ve anti-kanser aktiviteleriyle önemli 5 ikinci nesil Pİ öne çıkmaktadır (CFZ, IXS, Delanzomib, Oprozomib ve Marizomib) (Moreau ve ark., 2012). Bunlardan CFZ ve IXS tekli veya LLD ile kombinasyon halinde dirençli vakalarda kullanımı onaylanmıştır. Hastalarda düşük toksisite profiline sahip olmaları ve yaşam kalitesinde artış sağlamaları en önemli avantajlarıdır. CFZ epoksi-keton yapısıyla BTZ'den farklı olup, proteozoma kovalent formda geri dönüşümsüz bağlanmaktadır. CFZ'nin MM hücrelerinde BTZ'den farklı şekilde $\beta 2/\beta 5$ ko-inhibisyonu sağlayarak daha güçlü bir sitotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle Pİ-dirençli MM hücrelerinde daha etkili olduğu ifade edilmektedir (Ito, 2020). Diğer taraftan IXS, BTZ benzeri boronik asit bazlı yapısı ve oral kullanıma uygunluğuyla öne çıkmaktadır (Şekil 2.1) (Gulla ve Anderson, 2020).

Kapsamlı araştırmalarla Pİ direnç mekanizmaları ve çözümleri için stratejiler tanımlamıştır. En önde gelen çözüm BTZ direncine yönelik ikinci jenerasyon Pİ'lerin geliştirilmesi ve kullanımıdır. Diğer taraftan, Pİ direncinin giderilmesi için ikinci jenerasyon Pİ'lerin çeşitli kemoterapötiklerle kombinasyonları incelenmektedir. Örneğin, Pİ'ler ve histon deasetilaz inhibitörlerinin kombinasyonu güçlü anti-tümör etkisi göstermiştir. Çünkü söz konusu kombinasyonla hücrede histon deasetilazlar (Histone Deacetylase, HDAC) aracılığıyla ekspresyon profilinin değişmesi, Pİ'ler aracılığıyla protein kalite kontrolünün bozulması gerçekleşmektedir. Sonuçta hücrede proteostazın sürdürülmesini sağlayan agresom/otofaji yolu üzerinden daha güçlü stres oluşturulmaktadır (Moreau ve ark., 2012). Ayrıca Pİ direnç mekanizmalarına yönelik yeni bir yaklaşım stratejisi UPP'nin üst bileşenlerini hedeflemektir. Bu amaçla übikütinasyonu gideren enzimlerin (deubiquitylating enzymes, DUB) ve proteozom tanıma bölgesi 19S'interapötik hedeflemesine yönelik klinik öncesi çalışmalar yapılmıştır. Ancak ilk DUB inhibitörü klinik denemesi doz sınırlayıcı toksisite nedeniyle durdurulmuştur (Dou ve Zonder, 2014; Gulla ve Anderson, 2020).

2.1.8.2. Karfilzomib

BTZ'nin keşfi, ubiquitin-proteozom yolunun kanser tedavisi için hedef olmasını sağlamıştır. Söz konusu ilaçtan sonra daha etkili ve az toksik yeni nesil Pİ'ler araştırmaları hız kazanmıştır. Bunlardan CFZ potansiyeli güçlü, seçici ve geri dönüşümsüz bağlanan ikinci nesil bir Pİ'dir. Etkisi daha kalıcıdır ve varlığında proteozom aktivitesi %20'nin altına düşer. Ayrıca hedef dışı diğer proteazlarda minimal inhibisyon gözlenmektedir (Martens, 2018). CFZ, bakteriden izole edilmiş epoksomisin ilişkili bir peptittir ve Onyx Pharmaceuticals (Emeryville, CA) tarafından üretilmektedir. Bakteriyel orjini Q996-17 no.lu aktinomiset suşudur. Bu epoksomisinin proteozom inhibisyonu indükleme kabiliyeti nedeniyle güçlü anti-inflamatuar ve anti-proliferatif etkilere sahip olduğu gösterilmiş ve kimyasal olarak sentezlenmiştir (Munshi ve Anderson, 2013). PR-171 olarak da bilinen CFZ, 20S proteozomunun kimotripsin benzeri aktivitesini hedefler. Kimotripsin benzeri proteaza bağlanır ve diğer alt birimlere karşı aktivitesi düşüktür (Şekil 2.1) (Gertz ve Rajkumar, 2014; Usmani ve Nooka, 2018).

MM hücrelerindeki hedef proteozom, ubiquitin bağımlı hücrel protein işlemlerinden sorumlu multikatalitik proteaz kompleksidir (Şekil 2.1). 26S'lik kompleks, 19S ve 20S birimlerden oluşmaktadır. 20S'lik birim, her biri 7 alt ünite içeren 2 α ve 2 β halkadan oluşur (α 1–7; β 1–7). İç kısımdaki 2 β halka üç ana katalitik aktivitede görevlidir: kaspaz benzeri, kimotripsin benzeri ve tripsin benzeri proteolitik aktivitelerdir. Proteolizin hız sınırlayıcı adımı kimotripsin benzeri aktivitedir ve inhibisyon için birincil hedeftir (Martens, 2018). CFZ, düşük dozlarda proteozoma bağlanmakta ve kimotripsin benzeri aktiviteyi inhibe etmektedir. Yüksek dozlarda tripsin benzeri, kaspaz benzeri ve post-glutamil peptid hidrolizleme aktivitelerini inhibe etmektedir (Munshi ve Anderson, 2013).

Epoksiketon bazlı CFZ hematolojik tümör hücreleri üzerinde güçlü anti-proliferatif ve pro-apoptotik etkiye sahiptir. Çünkü kanser hücreleri söz konusu 20S birimin varyantını (i20S) eksprese eder. CFZ'in seçiciliğinde, kinaz ucundaki inhibitif NH₂-terminal treonin rezidüsü rol oynar. İki aşamalı mekanizmada, ilk olarak treonin hidroksil grubundaki oksijen ile epoksiketon karbon nükleofilik etkileşimi hemiasetal formasyona yol açar. İkinci aşamada, treonin α -amino azotu ile karbon-epoksit nükleofilik etkileşimi morfolino

addüksiyonu oluşturur (Martens, 2018). Bu inhibisyon, hücrede Bax gibi proteozom substratlarının akümülesyonunu indükleyerek kaspaz 3, 8 ve 9 aracılığıyla hücreleri apoptoza yönlendirir. Eş zamanlı olarak c-Jun N-terminal kinaz (JNK) aktivasyonlu sitokrom C (Cytochrome C, CytC) salınımıyla mitokondriyal membran depolarizasyonunu ve ikincil mitokondri türevli kaspaz aktivatörüyle apoptoz uyarır (Munshi ve Anderson, 2013). Ayrıca, fonksiyonel olmayan proteinlerin birikmesi, artmış NOXA seviyesi ve fosforile ökaryotik başlatma faktörü 2'nin (eIF2) düşük seviyesine bağlı ER stresi indüklenir (Martens, 2018).

BTZ proteozoma geri dönüşümlü bağlanır ve birçok proteazı inhibe ederek nörotoksisite oluşturur. CFZ ise geri dönüşümsüz bağlanması sayesinde periferik nöropati daha düşüktür (Gertz ve Rajkumar, 2014; Usmani ve Nooka, 2018). FDA relaps/refrakterli MM hastalarında CFZ monoterapisini 2012 yılında, kombine terapisini 2015 yılında onaylamıştır (Martens, 2018).

Diğer taraftan, CFZ aktivite gücünün yanı sıra kemosenitizasyon gücü ve dirençliliğin de üstesinden gelebilmektedir. CFZ'nin DEX ile kombinasyonu ile güçlü sinerjistik anti-miyelom aktivitesi gösterilmiştir (Martens, 2018). Ayrıca BCL2, BCLXL, BCL2 benzeri protein 2, (BCL2-like protein 2, BCLW) ve MCL1 gibi anti-apoptotik BCL2 ailesi üyelerini inhibe edici bir ajanla kombinasyon güçlü bir strateji olarak öngörülmektedir (Munshi ve Anderson, 2013).

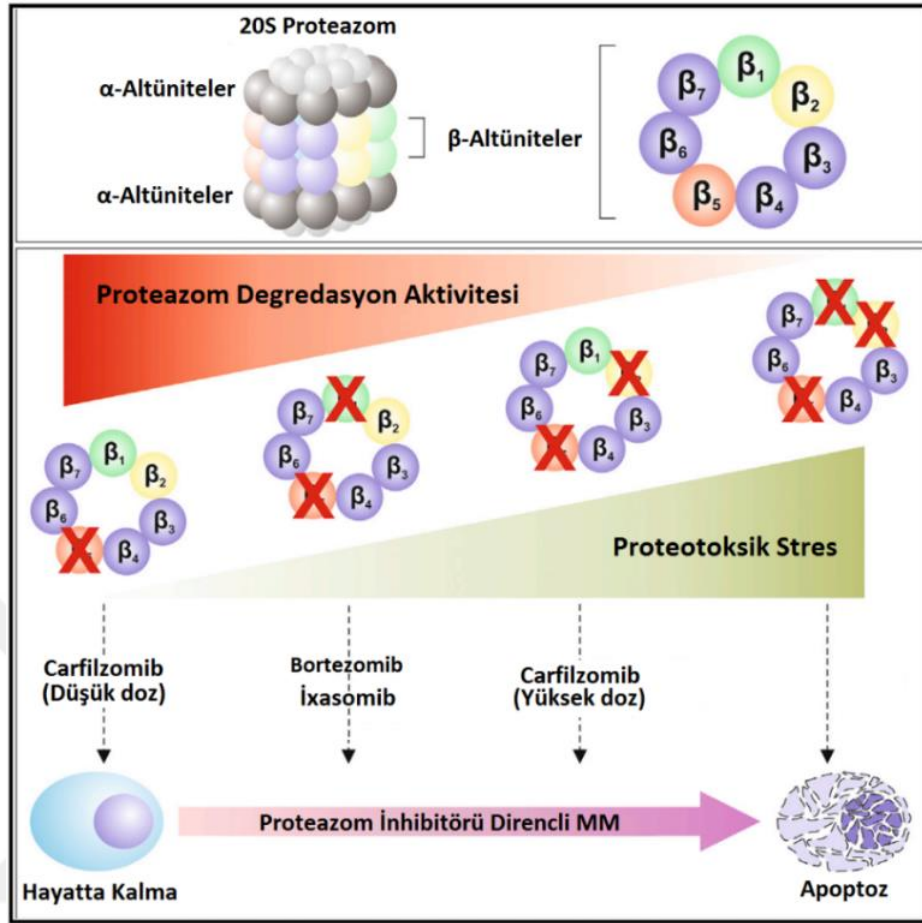
2.1.8.3. İksazomib

IXS, Millennium Takeda (Cambridge, MA) tarafından geliştirilen ve oral formülasyonda klinik çalışmalara giren ilk Pİ'dir (Munshi ve Anderson, 2013). Moleküler yapısı dipeptit formda P-1 pozisyonunda lösin, P-2 pozisyonunda glisin içerir. Biyolojik olarak aktif yapıyı dipeptidil lösin boronik asit oluşturur ve inaktif formda hidrolize sitrat esteridir (Gertz ve Rajkumar, 2014). İnaktif formdaki siklik boron su veya plazmaya maruz kaldığında boronik aside hidrolize olarak aktifleşir. Hücrede 20S proteozomun β5 (beta 5) konstitütif proteozom alt birimine güçlü, geri dönüşümlü, spesifik bir inhibitör olarak bağlanır ve kimotripsin benzeri aktivitesini engelleyerek faaliyet gösterir (Şekil 2.1) (Raedler, 2016).

IXS, BTZ ile karşılaştırıldığında benzer seçiciliğe ve potansiyele sahiptir, ancak proteozomdan çabuk ayrılma, kısa yarılanma ömrü, doku penetrasyonundaki hızlilik ve anti-tümör aktivitesi açısından üstün farmako-dinamiklere sahiptir (Usmani ve Nooka, 2018). Çünkü BTZ ile kıyaslandığında 20S proteozomun $\beta 1$ ve $\beta 2$ alt birimlerine afinite ve bağlanma açısından daha zayıftır. Bu sayede proteozomun tekrar bir araya gelme süresi BTZ için 110 dakika, IXS için 18 dakika olarak ölçülmüştür. Bu durum IXS açısından dezavantajlı bir özellik gibi görünse de, kandaki proteozomlardan daha hızlı ayrılarak tümör dokularında akümülyasyonunu sağlamaktadır. İlave bir üstünlük olarak, maksimum tolere edilen dozların belirlendiği *in vivo* çalışmalarda IXS, BTZ'den daha yüksek kan hacmine ulaşmıştır (Munshi ve Anderson, 2013).

IXS, *in vivo* MM modelleri de dahil olmak üzere solid tümör ve hematolojik malignite ksenograft modellerinde anti-tümör aktivitesi göstermektedir (Gertz ve Rajkumar, 2014). Özellikle tedaviye dirençli miyelom hücrelerine karşı güçlü sitotoksik etkiye sahiptir ve hücre kültürü testlerinde NF κ B'nin aktivasyonunu da inhibe ederek apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Munshi ve Anderson, 2013; Raedler, 2016). Anti-tümör aktivitesi hücre hatlarında değerlendirilmiştir. IXS, BTZ ile kıyaslandığında tümör gelişmesini daha etkili biçimde baskılamıştır. Farmako-dinamik veriler, kan ve kemik iliği kompartmanlarında %83-84 proteozom inhibisyonu, tümör yükünde azalma ve sağkalımda belirgin bir artış sağlamıştır (Munshi ve Anderson, 2013).

FDA, 20 Kasım 2015 tarihinde IXS'nin kullanımını onaylamıştır. Hastaların öncesinde en az 1 tedavi görmüş, relaps veya refrakter durumda olmaları gereklidir (Raedler, 2016). Hastalarda IXS tolerasyonu iyi olmakla birlikte gastrointestinal ve hematolojik yan etkiler vardır. BTZ'nin aksine, anlamlı bir periferik nöropati ile ilişkili değildir (Gertz ve Rajkumar, 2014; Greer ve ark., 2018).



Şekil 2.1: 26S Proteozomun yapısı, 20S katalitik çekirdek ve iki 19S düzenleyici birimden oluşan proteaz kompleksidir. Proteozom inhibitörleri β alt birimlerini hedeflemek için tasarlanmıştır (Besse ve ark., 2018 kaynağından uyarlanmıştır).

2.1.8.4. Venetoklaks

VNT’inde yer aldığı BH3-mimetik ilaçlar, apoptozu tetiklemek için BCL2 ve ilgili proteinlerin fizyolojik antagonistlerinin aktivitesini taklit eden yeni bir anti-kanser ajan sınıfıdır (Roberts ve ark., 2016). BCL2 ailesi proteinleri, birbirleriyle etkileşim halinde olup anti-apoptotik ve pro-apoptotik üyeler arasındaki denge apoptozu yönlendirmektedir. Yapısal ve fonksiyonel özelliklere göre anti-apoptotik proteinler (BCL2, BCLXL, BCLW, A1 ve MCL1) ve pro-apoptotik proteinler (BIM, BAD, BID, HRK, NOXA, BAK ve BAX) olarak iki sınıfa ayrılırlar. Anti-apoptotik aile üyeleri, pro-apoptotik aile üyelerini sekestre ederek hücrenin hayatta kalmasını destekler. Anti-apoptotik proteinlerin yokluğunda, pro-apoptotik proteinler aktifleşerek mitokondriyal

dış zarda büyük gözenekler oluşturmak üzere oligomerize olabilirler. Böylelikle mitokondriden CytC'nin salınımı ve devamında kaspaz kaskadının aktivasyonu ile içsel apoptoz etkinleştirilmesi sağlanır (Tahir ve ark., 2017). Söz konusu proteinler için tümöre özgü ekspresyon profilleri gözlenmektedir. Örneğin; KLL'de anti-apoptotik BCL2, BCLXL ve MCL1 proteinleri ile Pro-apoptotik BAX ve BAD proteinleri aşırı eksprese edilir. Malign hücrelerde BCL2'nin ekspresyon artış mekanizması miRNA aracılı değişiklikleri içerir ve CBCL2'nin promotör bölgesi hipo-metillenerek ekspresyonun artışı sağlanır. Bu özel yapılanma klinikte tedaviye imkân veren bir hedef sunar (Şekil 2.2) (Provan ve Gribben, 2020).

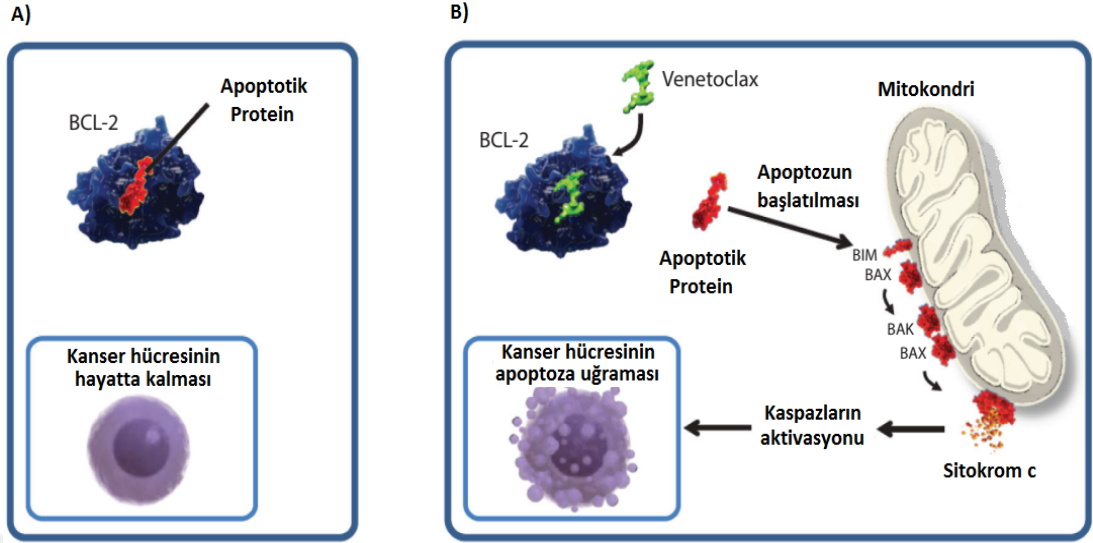
VNT seçici, güçlü ve oral kullanılan bir BCL2 inhibitörüdür. Yapısal formülü $C_{45}H_{50}ClN_7O_7S$, moleküler kütlesi 868.4 g/mol'dür (Şekil 2.3a) (Martens, 2018). İlaç, plazma proteinlerine (>%99) yüksek oranda bağlanır ve 16-19 saatlik terminal yarılanma ömrüne sahiptir. CYP3A4/5 tarafından metabolize edilir ve P-glikoprotein akış pompası için substrattır (Mihalyova ve ark., 2018). Etkinliği, pro-apoptotik proteinlerin akümüasyonu ile tümör hücrelerinde apoptozu tetikleme şeklindedir (Şekil 2.3b). Özellikle pro-apoptotik proteinleri düzenleyen BCL2'nin BH3 alanını hedeflemek için tasarlanmış olup, domaine yüksek afinite sergiler ve muhtemel bağlanmaları engeller (Mihalyova ve ark., 2018).

BCL2 inhibitörlerinde strateji, pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeler arasındaki BH3 domaini-aracılı etkileşimin önlemesidir. İnhibitörle, hücre hayatta kalma proteinleri olan BCL2 ve BCLXL inhibe edilerek apoptoz indüklenir. Söz konusu inhibitörlerin geliştirilmesi 3 aşamada olmuştur ve yapılan çalışmalar sonucunda özgün bir moleküler tasarımla oral kullanıma uygun VNT geliştirilmiştir. İnhibitör molekül yapısında BH3 bağlanma alanını düzenleyen tiyofenil birimi bulunmamaktadır (Hoffman, 2018). Çeşitli hücresel modellerde ve primer hasta örneklerinde *ex vivo* olarak çalışılmıştır. Etkinliği BCL2 ekspresyonu ile güçlü korelasyon göstermekte ve apoptozu indüklenmektedir. VNT, BCL2'ye oldukça yüksek afiniteyle bağlanmakta olup hedef dışı etkileşim ve Trombositopeni açısından avantajlıdır (Roberts ve ark., 2016).

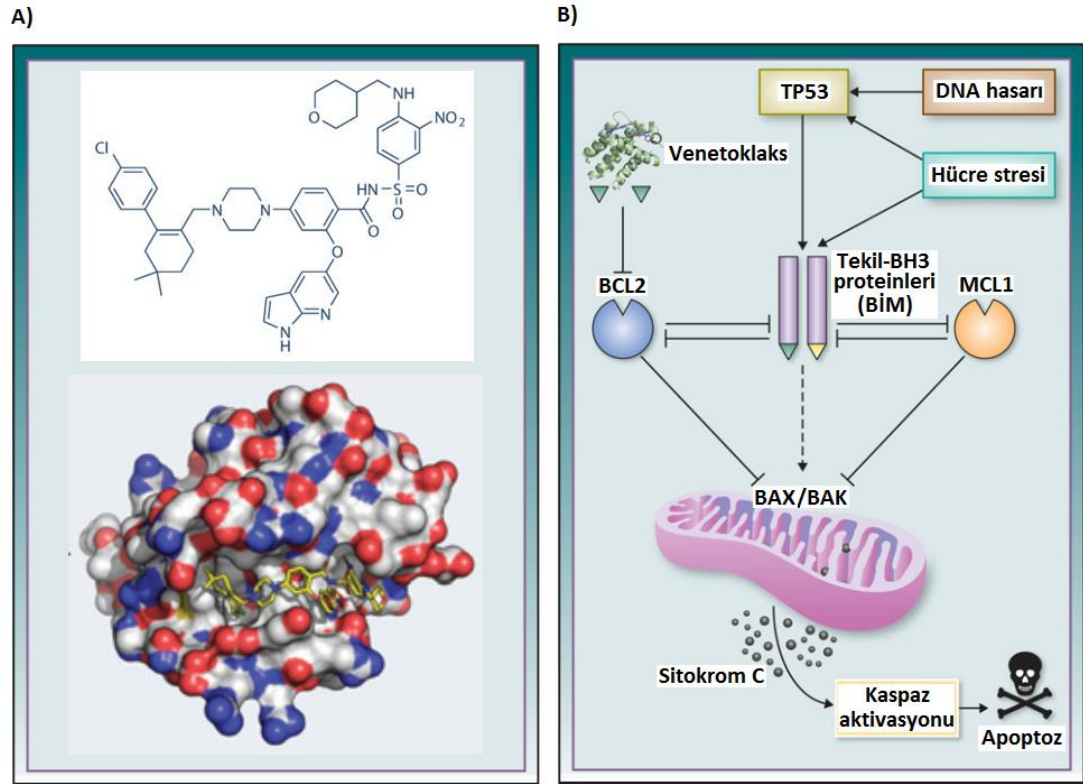
Klinik öncesi çalışmalar, güçlü *in vitro* etkiler bildirmiştir (Provan ve Gribben, 2020). İnhibitör, hücrelerde BAK ve BAX'ın aktivasyonu sonrası mitokondriyal CytC salınımla apoptoza yol açmaktadır (Martens, 2018). Multipl miyelom hücre hatları da VNT'a duyarlılık göstermiş, BCL2, BCLXL ve MCL1'in ekspresyon profili tedavi yanıtı ile ilişkilendirilmiştir (Martens, 2018).

BCL2 inhibitörleri arasında sadece VNT yüksek özgüllük ve düşük toksisiteyle kullanıma girebilmiştir (Martens, 2018). Klinik deneyimleri umut vericidir ancak hastalarda tümör lizis sendromu (TLS) gelişmesi problem olmuştur. TLS'ye bağlı problemler hedef doza kadar kademeli artışı modifikasyonu, yoğun profilaksi ve takiple giderilmiştir. Relaps/refrakterli KLL hasta popülasyonunda dikkate değer sonuçlar elde edilmiştir. Günümüzde, del(17p)'li relaps/refrakter KLL hastalarında güçlü klinik aktivitesiyle kullanım onaylıdır. Bununla birlikte, hematolojik malignansilerde kullanımı TLS riskiyle sınırlanmaktadır (Hoffman, 2018). Klinik sonuçlara göre VNT kan ve kemik iliğinde lenf nodlarına göre daha etkilidir. Gelecek dönem araştırmaları bu rezidüel kalıntıların dirençlilikle ilişkisini açıklamaya odaklanmaktadır (Rossi, 2016).

VNT'nin klinik çalışmalarda değerlendirmesi devam etmektedir (Martens, 2018). MM, anti-apoptotik proteinlere bağımlılık açısından heterojendir ve hastalarının alt bileşenlere hangi oranlarda bağımlı olduğu incelenmektedir. Bununla birlikte, VNT MM hastalarının özellikle translokasyon t(11;14) mutasyonu olan alt kümesinde güçlü yanıt oluşturmaktadır. Çünkü bu hastalar translokasyona bağlı olarak daha yüksek BCL2/MCL1 mRNA oranına sahiptir. İlginç şekilde, yüksek riskli 17p delesyonu varlığında bile MM'nin bu alt grubunda iyi yanıt gözlenmektedir (Martens, 2018; Mihalyova ve ark., 2018). Yaygın yan etkiler bulantı, trombositopeni, anemi, lökopeni, nötropeni, enfeksiyöz komplikasyonlar, kusma ve ishaldir (Greer ve ark., 2018).



Şekil 2.2: BCL2'nin VNT ile sekestrasyonunun etkisi. A) Kanser hücrelerinde aşırı BCL2 ekspresyonu pro-apoptotik proteinleri sekestre ederek apoptozdan kurtulmaya yol açar. B) VNT özgün biçimde BCL2'ye bağlanır ve programlanmış hücre ölümünü (apoptoz) başlatan pro-apoptotik proteinleri serbest bırakır (Mihalyova ve ark., 2018; Provan ve Gribben, 2020 kaynaklarından uyarlanmıştır).



Şekil 2.3: Mitokondriyal apoptozda etkileşime giren moleküllerin özeti. A) VNT'nin kimyasal yapısı ve BCL2 ile etkileşimi. B) VNT, BH3 taklidi görevi görür ve BCL2'yi inhibe eder. BAX / BAK aktivasyonu ve bunların dış mitokondriyal membrana delokalizasyonu depolarizasyonla CytC salınımını ve kaspaz aktivasyonu indükler. Sağlıklı hücrelerde BCL2, BAX ve BAK aktivasyonunu repress eder (Croce ve Reed, 2016; Martens, 2018; Roberts ve ark., 2017 kaynaklarından uyarlanmıştır).

2.1.9. Multiple Miyelom'da Alternatif Tedavi Yöntemleri

Terapotik gelişmelere rağmen MM tedavisinde yanıt belirli bir süre için gözlenmekte olup hastalar uzun vadeli ve tam iyileşmede yeni metodlara ihtiyaç duymaktadır (Matulis ve ark., 2016). Otolog kök hücre nakli plazma hücre sayısını verimli bir şekilde azaltsa da vakalarda kemoterapiye dirençli malignant hücreler nedeniyle replaps gözlenmektedir. Bu süreçte MM'deki tümör kök hücrelerin kemoterapötik ajanlara direnç gelişmesinde etkinlik gösterdikleri raporlanmıştır (Thakur ve ark., 2015).

Günümüzde immün modülatörler ve proteozom inhibitörleri birinci basamak tedavinin temel unsurlarıdır. Bu süreçte hastalar için önemli olan tedaviye yanıt süreleri ve toksisite riskidir. Kemik iliği mikroçevresi ve MM biyolojisinin daha iyi anlaşılmasıyla etkili anti-kanser ilaçları ve kombinasyonları üretilmektedir (Raedler, 2016). Pİ ve IMiD ilaçlarda ikinci nesil daha güçlü ilaçların geliştirilmesi dirençliliği önemli ölçüde gidermiştir. Ayrıca uzun dönemde ilaç dirençliliğine aracılık eden sinyal yollarını hedefleyen kombinasyon terapileri de seçenek oluşturmuştur (Gulla ve Anderson, 2020). Bunlardan öne çıkanları: RAS veya BRAF mutasyonlarına bağlı RAS sinyal yolu aktivasyonunda vermurafenib tekil veya kobimetinib kombinasyonlu kullanımı, t(11:14) genetik lezyonuyla BCL2 aşırı ekspresyonunda VNT kullanımı, JAK2 sinyal yolu aktivasyonunda ruxolitinib kullanımı, NFκB aktivasyonunda BTZ ile DANFIN kombinasyonlu kullanımı, MDM2 aşırı ekspresyonunda DS-3032b kullanımı ve PI3K/mTOR aktivasyonunda BEZ235 kullanımıdır. Ek olarak, HDAC inhibitörlerinin, t(4;14) translokasyonlu miyelom hücrelerinde fibroblast büyüme faktör reseptörünün inhibisyonu, miyelo sitomatozis onkogeninin ekspresyonunu hedefleyen Bromodomain ve ekstra terminal (BET) protein antagonistlerinin değerlendirmeleri olumlu bulunmuştur (Anwer ve ark., 2019).

MM alternatif tedavi yöntemlerine yönelik araştırmalar devam etmektedir. Örneğin, nükleer dışı aktarımının seçici bir inhibitörü olan selinexor yakın tarihte refrakter MM hastaların üçlü kombine kullanımı için onaylanmıştır. İnhibitör etkinliğiyle tümör baskılayıcı proteinlerin, büyüme faktörlerinin ve onkojenik protein mRNA'larının geçişi engellenmektedir (Gulla ve Anderson, 2020). Staudinger ve ark. (2014), *Pseudomonas*

aeruginos'nın endotoksin A'sını hücre belirtecine duyarlı antikora eklenerek immünotoksin üretilmiştir. Söz konusu antikor, sağlıklı hücelere karşı sitotoksik olmayıp miyelom hücre hatlarının büyümesini inhibe etmiştir. Böylelikle plazma hücre tümörlü hastalarda hücre belirtecine dayalı bir metodun spesifik ve etkili immünotoksin tedavisi için kullanılabileceğini gösterilmiştir (Staudinger ve ark., 2014).

Hasta direnç ve duyarlılığına yönelik biyolojik belirteçlerinin tanımlanması da alternatif metodlara aracı olmaktadır. En bilinen örneği apoptoza dirençlilikle ilişkilendirilen BCL2 ailesi protein etkileşimleridir. Bu bağlamda BCL2, BCLXL veya MCL1 anti-apoptotik üyeleri tedavi için kullanışlı bir hedefi temsil etmektedir. VNT, bu üyelerden BCL2'ye yüksek afiniteli bir BH3 mimetik inhibitördür. MM tedavisinde t(11;14)'lü hastalarda kullanılmıştır (Gulla ve Anderson, 2020; Touzeau ve ark., 2018).

MM'de yeni bir araştırma alanı bağırsak mikrobiyomunun MM üzerindeki rolünü değerlendirmektir. Bu alanda yapılan araştırmalarda bağışıklık sistemi üzerine yapılan uyarıcı etkilerin olumlu ve olumsuz sonuçları gözlenmiştir. Örneğin, bağırsak mikrobiyotasında *Prevotella heparinolytica*'nın MM ilerlemesini desteklediği raporlanmıştır. Benzer şekilde allojenik kök hücre transplantasyonundan sonra Bağırsak florasında *Eubacterium limosum* bakterilerinin bolluğu relaps ile ilişkilendirilmiştir. Diğer taraftan, bağırsak mikrobiyotasında *Eubacterium hallii*'nin yüksek varlığı uzun dönemli hayatta kalma başarılmasıyla ilişkilendirilmiştir (Gulla ve Anderson, 2020).

Bağışıklık sistemi aracılığıyla malignansilerde terapinin hedeflenmesi 1893'e kadar uzanmaktadır. İlk örnek William Coley'in, Coley toksini olarak isimlendirdiği metotta kanser hastalarında *Streptococcus pyogenes* ve *Serratia marcescens* bakterilerinden hazırlanan aşı kullanılmıştır. İkinci örnek tüberküloz aşısı olarak geliştirilen Bacillus Calmette-Guerin hücre duvarı iskeletinin (Bacillus Calmette-Guerin cell wall skeleton, BCG-CWS) antineoplastik aktivitesinin belirlenmesidir (Killeen ve ark., 2006). BCG-CWS, FDA onaylı olup günümüzde mesane kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. BCG-CWS, söz konusu etkiyi hücrelerde bulunan TLR'leri uyarak sağlamaktadır. Farklı kanser türlerinde araştırma yapılmıştır. 1960'ların başlarında Mathe, Bacille Calmette-Guérin (BCG) basili enjeksiyonları ile tedavi edilen pediatrik lösemi hastalarında artan

sağkalımı tanımlamıştır. Ayrıca BCG aşısı evre III melanomun bazı vakalarında yardımcı tedavi olarak kullanılmaktadır (Du ve ark., 2016; Monlish ve ark., 2016).

Kanser vakalarında üstte örnekleri verilen immüno-terapiklerin etki mekanizması için hücresel bileşenler incelendiğinde Toll like reseptörleri öne çıkmaktadır. Nitekim hücredeki farklı TLR'leri uyaran stimülantlarla tümör hücrelerin davranışının düzenlendiği birçok araştırma mevcuttur. Buna göre BCG, hücrede TLR2 ve TLR4 sinyallesini güçlü bir şekilde uyarak yanıt oluşturmaktadır. Imiquimod, TLR7 agonisti olup çeşitli deri tümörlerinin ve epidermal metastazların tedavisinde etkilidir. Monofosforillipid A (MPL), HPV ilişkili servikal kanser aşısı Cervarix'in adjuvanı olarak onaylanmıştır. Çift sarmallı RNA (dsRNA)'nın, tümör hücrelerinde TLR3'ü aktifleştirerek tip 1 interferon (IFN) salgılanmasını indüklediği ve apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (Du ve ark., 2016; Killeen ve ark., 2006).

MM açısından, geleneksel tedaviler günümüzde TLR sinyal yoluna dayalı herhangi bir içeriğe sahip değildir. TLR sinyal yolu manipülasyonla düzenlenebildiği için MM'de hedef olabilir. Bu amaçla geliştirilecek immünoterapi yaklaşımları, kemoterapi direncinin kırılmasında, miyelom hücrelerinin hedeflenmesi ve yok edilmesinde araç olabilir (Thakur ve ark., 2015). Çünkü MM'de birçok hücre hattı ve primer tümör hücreleri TLR 1, 2, 3, 4, 7, 8 ve 9'u ifade etmektedir. Benzer bir ekspresyon profili normal plazma hücrelerinde veya B hücrelerinde gözlenmemektedir. Ayrıca MGUS'tan MM'ye geçiş sırasında TLR ekspresyonunda hem artış hem de farklı TLR'lere yönelik kazanım saptanmıştır (Chiron ve ark., 2008).

MM patolojisini etkileyen sinyal yolu değişikliklerin daha iyi anlaşılması yeni terapi metodlarının geliştirilmesine imkan sağlayacaktır (Anwer ve ark., 2019). MM hücreleri, TLR ligandlarıyla uyarıldıklarında genellikle kuvvetli bir şekilde artan proliferasyon yanıtı üretmektedir. Hücre hatlarında söz konusu etkinin MM büyüme faktörü IL-6'nın otokrin salgılanması ile sağlandığı gösterilmiştir, ancak IL-6'dan bağımsız artışlar da mevcuttur (Chiron ve ark., 2008). Günümüzde her bir TLR çeşidine özgü yanıt oluşumu ve hastalığa yönelik kullanımı araştırma konusudur. Genel başlıklarıyla sıralanacak olursa: i)tümör dokularındaki TLR ekspresyon seviyelerinin ve aktivitelerinin

saptanması, ii)TLR agonisti kullanılarak tümör antijenlerine karşı immün fonksiyonu indüklenmesi, iii)TLR agonistlerinin doğrudan anti-kanser etkilerinin değerlendirilmesi, iv)tümörojenik koşulların TLR ile ilişkili olduğu vakalarda TLR antagonistleri anti-kanser etkilerinin değerlendirilmesi şeklindedir (So ve Ouchi, 2010).

MM’de TLR açısından önemli araştırmalar ve sonuçları şunlardır: MM hücrelerinde TLR5 üzerinden sinyal oluşturan Flagellin türevi CBLB502 agonisti incelenmiştir. Hücrelerde, NFκB aktivasyonunun artan proliferasyon, IgG üretimi ve IL-6 ekspresyonuna neden olduğu raporlanmıştır. Flagellin uygulaması kaspaz aktivitesini inhibe ederek MM hücrelerinin apoptoz ve kemoterapik ilaç dirençliliğine katkı sağlamıştır (Thakur ve ark., 2015). TLR9 agonisti olan C792, miyelom hücresi büyümesini indükleyen plazmasitoid dendritik hücreleri hedef alarak işlev görmüştür. Böylelikle MM hücre hatlarında kemoterapotiklerin antitümöral aktivitesini arttırmış ve plazmasitoid dendritik hücrelerin MM hücreleri üzerindeki proliferatif etkilerini engellemiştir (Ray ve ark., 2014). TLR3 agonistinin, NFκB aktivasyonu aracılığıyla tip I interferon üretiminin kanser hücrelerinde apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (Salaun ve ark., 2006). Abdi ve ark. (2014), TLR1/2'yi uyaran Pam₃CSK₄'ün BTZ ile kombine edildiğinde miyelom hücre hatlarında kaspaz 3 aktivitesini arttırdığını ve apoptozu indüklediğini göstermiştir (Abdi ve ark., 2013; Abdi ve ark., 2014).

TLR ile indüklenen hücre ölümünün immünojenikliği doğrulanabilirse bu önemli bir terapötik avantaj sağlaması muhtemeldir. Bu durumda TLR agonistleri çok fonksiyonlu adjuvanlar olarak görev alabilecektir. Etkileri, *in situ* koşullarda tümör antijenlerine bağlı immünojenik hücre ölümünün indüksiyonunu şeklinde olacaktır. Böylelikle antitümöral immün yanıtın nicel ve nitel olarak iyileştirilmesi muhtemeldir (Salaun ve ark., 2006; Thakur ve ark., 2015).

2.2. Toll Like Reseptörleri

TLR'ler, evrimsel olarak korunmuş farklı moleküler formlara duyarlı immün yanıtta görevli reseptörler ailesidir (Du ve ark., 2016). Bağışıklık hücrelerinde eksprese edilir ve tanımlamada PAMP'ları kullanırlar. PAMP için lipidler, lipoproteinler, proteinler ve nükleik asitler ligand olabilmektedir (Kawai ve Akira, 2007). Diğer taraftan, Patojenle

ilişkili olmayan hasara bağlı molekül formları da (damage-associated molecular patterns, DAMP) TLR uyarımı yapabilmektedir. DAMP'lar nükleik asitler, hücre dışı matris bileşenleri gibi hücrel hasarın çeşitli endojen yan ürünlerinden oluşabilmektedir (Monlish ve ark., 2016).

İnsanda 10 tip TLR tanımlanmıştır ve hücrel lokalizasyonlarına göre iki alt gruba ayrılmıştır. TLR 1, 2, 4, 5, 6 ve 10 hücre yüzeyinde bulunur ve esas olarak lipidler ve bakteri proteinleri gibi PAMP'lara yanıt verir. TLR 3, 7, 8 ve 9 ise hücre içindeki endozomlarda yer alır ve virüs/bakteri kaynaklı nükleik asitlere yanıt verir (Kanzler ve ark., 2007). Hücre içi TLR'ler özellikle viral ve bakteriyel nükleik asitleri algılar. Viral partiküller endozomlarda veya lizozomlarda degradasyona uğrar. Parçalanma viral DNA ve RNA'nın salınmasına neden olarak TLR'lerin algılamasına izin verir (Kawai ve Akira, 2007). TLR'lerin genel özellikleri Tablo 2.3'te verilmektedir.

2.2.1. Toll Like Reseptörleri ve Kanser İlişkisi

Birçok tümör hücre hattında, primer hücresinde veya dokusunda TLR'lerin yüksek ekspresyonu bildirilmiştir. Ekspresyon artışı sıklıkla tümör ilerlemesine yol açtığı için TLR sinyal yolundaki proteinler genellikle kansere karşı tedavi için önemli hedefler olarak kabul edilir. Söz konusu TLR varlığı ve çeşitliliği değişkenlik göstermektedir. Bu yüzden TLR dağılımının, tümöre özgü ekspresyonunun ve belirli tümör türlerinde TLR ligandına tepkisinin belirlenmesi kanser terapisi stratejisi açısından yeni bir araştırma alanıdır (So ve Ouchi, 2010). Örneğin TLR4, kolorektal neoplazi inflamasyonu ile ilişkili olup insan ve farede aşırı eksprese edildiği belirlenmiştir. Bu süreçte kolon karsinogenezi için TLR4 sinyal yolağının kritik önem sahip olduğu ve inhibisyonun tedavi amaçlı kullanılma kullanılabileceği raporlanmıştır (Fukata ve ark., 2007). Reseptörlere özgü ligandların aktivasyonu ile tümör gelişimi olumlu/olumsuz etkilenebilmektedir. Örneğin, meme kanseri hastalarında yapılan incelemede tümör hücrelerinde aşırı TLR3 ekspresyonu saptanmıştır. Hücrelerin TLR3 özelliği apoptoza duyarlılık için kullanılarak poli-AU ligandı ile klinik çalışma yapılmıştır. 20 yıllık retrospektif analizde artmış sağkalım oranı raporlanmıştır (Salaun ve ark., 2006). Ayrıca tümör modellerinde TLR'deki genetik varyasyonun tümör ile ilişkili olabileceği raporlanmıştır. Buna göre *TLR4* gen

sekansının 299. pozisyonunda asparajinin glisin ile, 399. pozisyonunda treoninin izolösin ile yanlış anlamlı mutasyonu belirlenmiştir. Mutant *TLR4* geni ve anormal *TLR4* ekspresyonunun kanser tedavisine dirençlilikle ilişkili olduğu ifade edilmiştir (So ve Ouchi, 2010). Diğer taraftan, *TLR4*'ün akciğer epitelinde kansere karşı koruyucu etkisi gözlenmiştir. Bu yüzden farklı kanserlerde TLR konusunda daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Du ve ark., 2016).

Kanser progresyonu açısından düşünüldüğünde söz konusu sinyal yolundaki etkileşimlerin terapi amacıyla kullanılması olasıdır. Örneğin, MDS hastalarında *TLR2* antikorumun (OPN-305, Opona Therapeutics, Dublin, İrlanda) ikinci basamak tedavide kullanım için faz I / II çalışması yapılmıştır. Araştırmada, sınıflandırma faktörü 34'e sahip (classification determinant, CD34+) MDS hücrelerinde *TLR2* inhibisyonu sonucu iyileşmiş eritroid koloni oluşumu gösterilmiştir. Waldenstrom makroglobulinemi hastalarında TLR sinyal yolunun merkezi adaptör görevindeki Miyeloid farklılaşma birincil yanıt proteinini (myeloid differentiation primary response protein 88, MyD88) aktifleştiren L265P mutasyonu belirlenmiştir. Bu bağlamda MyD88 inhibisyonu olası bir terapötik strateji sunmaktadır. Çünkü Malignant transformasyonda MyD88, kemik iliğinde plazma hücresi oluşumunda merkezi role sahiptir. Plazma hücre farklılaşmasında TLR profilinin ayırt edici özelliğini sağlamaktadır (Chiron ve ark., 2008). Klinik öncesi çalışmalarda, MyD88 veya alt sinyal yolu bileşenleri IL-1 reseptörü ilişkili kinaz 1 (Interleukin-1 receptor-associated kinase 1, IRAK1) ve IL-1 reseptörü ilişkili kinaz 4 (Interleukin-1 receptor-associated kinase 4, IRAK4) kaybının NFκB aktivasyonunun baskıladığını ve Waldenstrom makroglobulinemi hücre ölümünü indüklediğini göstermiştir (Monlish ve ark., 2016). MM açısından da MyD88 adaptör proteini oldukça önemlidir.

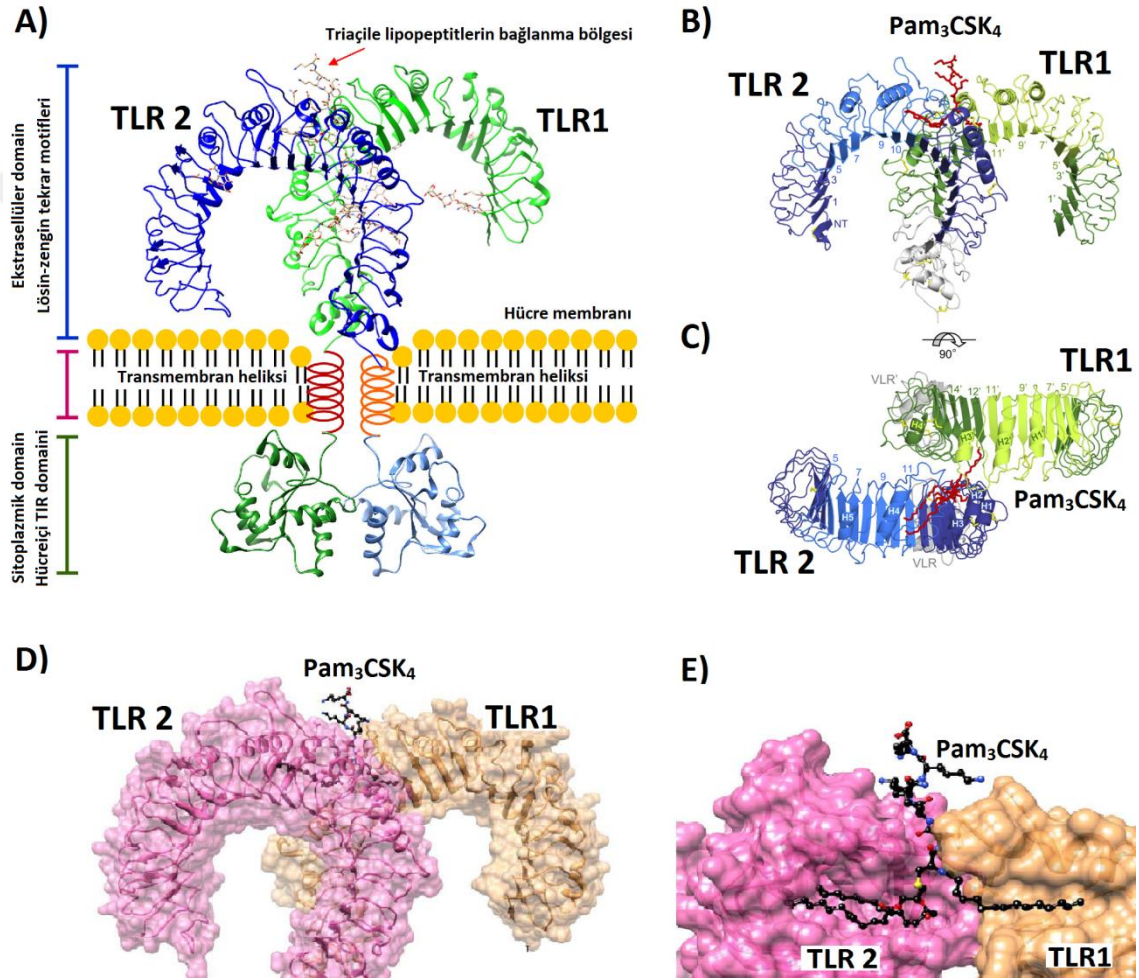
Ligand olarak görev alan agonistlerin veya ligandla bağlanma rekabeti gösteren antagonistlerin gelecekte klinik uygulamalara girmesi muhtemeldir (Thakur ve ark., 2015). Moleküler olarak tanımlı TLR agonistlerinin kanser tedavisinde kullanımı önemli bir çalışma alanıdır ve faz I-II klinik deneyleri devam etmektedir. TLR ligandlarının klinik anti-tümör aktivitesi çeşitli mekanizmalarla sağlanabilir. TLR agonistlerinin, TLR-pozitif tümör hücrelerini apoptoz ile doğrudan öldürmesi nedeniyle bu durumun kanser

tedavisinde pro-apoptotik aktivite olarak kullanımı hedeflenmektedir (Salaun ve ark., 2006). Literatürde yapılan bazı çalışmalar şunlardır: TLR3'ün tümör hücrelerinde apoptozu uyarmada etkili olduğu gözlenmiştir. Buna göre meme kanseri hücreleri TLR3 agonisti olan dsRNA tarafından aktive edildiğinde apoptoza aracılık eden otokrin tip I IFN ürettiği raporlanmıştır. Tip I ve II akciğer kanseri hücrelerindeki aktivasyonunun kaspaz 8 üzerinden tümör hücresi ölümüne yol açan apoptotik yolları aktifleştirdiği raporlanmıştır (Du ve ark., 2016). TLR3 agonisti poliinosinik-polisitidilik asit (poli I:C) ile MM hücre hatlarında stimülasyon hücre büyümesini inhibe etmiştir. Bu süreçte hücrelerde NFκB yolağının ve tip I IFN sekresyonunun indüklenmesi apoptoza yönelimi sağlamıştır. Benzer şekilde poli I:C aracılığıyla primer AML hücrelerinin stimülasyonu, tip I IFN indüksiyonuna ve artmış apoptoza yol açmıştır (Monlish ve ark., 2016). Kolon kanserinin erken teşhisi için hipermetile genlere dayalı tanı yönteminde TLR2 hipermetilasyonun kanser hücrelerinde gen susturucu etkisi gözlenmiştir (So ve Ouchi, 2010). DAMP olarak bilinen ve TLR'ler tarafından tanınan tehlike sinyallerinin organizmada tümöre yönelik bağışıklık yanıtını tetiklediği belirlenmiştir. Buna göre glioblastomda TLR2 ligandı ile aktivasyonun bağışıklık sistemi hücrelerini uyararak antitümör immün yanıtı aracılık ettiği bildirilmiştir (Du ve ark., 2016). TLR1/2 ligandı Pam₃CSK₄ ile uyarılan ALL hücre hatları ve primer örneklerde vinkristin aracılı toksisiteye duyarlı hale geldiği ve kaspaz 8 aracılı apoptozun tetiklendiği belirlenmiştir. Ignatz-Hoover TLR 7/8 agonisti R848'in AML hücre hatlarının ve primer hasta örneklerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. Bu sürecin hücrelerde *in vitro* terminal farklılaşmasının desteklenmesi ve TLR 8–MyD88–p38 sinyal yoluna bağlı bir şekilde gerçekleştiği gösterilmiştir. R848'in, fare ksenograft modelinde tümör büyümesini önemli ölçüde inhibisyonu raporlanmıştır (Monlish ve ark., 2016).

2.2.2. Toll Like Reseptörlerinin Yapısı

TLR'ler, sitoplazmik ve ekstrasellüler domainler ile karakterize edilen tip I membran glikoproteinlerdir. Sitoplazmik domain, Toll/ IL-1 reseptör (Toll/interleukin-1 receptor, TIR) sinyal oluşturma birimine sahiptir. Evrimsel olarak korunmuş ekstrasellüler domain ise antijen tanıma görevinde 19-25 tekrarlı lösin açısından zengin tekrar (leucine-rich repeat, LRR) motiflerine ve sistein içeriğine sahiptir. LRR'nin antijen bağlama bölgesi

halkasal formdadır ve TLR'ler arasında benzerlik göstermektedir (Du ve ark., 2016) (Şekil 2.4). Birçok durumda TLR'ler kovalent olmayan dimerler oluşturma eğilimindedir. TLR2, TLR1 veya TLR6 ile heterodimerleri oluştururken, diğer TLR'ler homodimerler olarak birleşmektedir. PAMP/DAMP algılanması bu dimerlerle sağlamaktadır (Kanzler ve ark., 2007). Örneğin; TLR3 homodimeri çift sarmallı RNA'yı, TLR1 – TLR2 heterodimeri triaçile lipopeptitleri tanır (Harsini ve ark., 2014).



Şekil 2.4: TLR1 - TLR2 heterodimerinin ve ligand bağlanma bölgesinin temsili yapıları. A) TLR yapısını oluşturan 4 kritik bileşen: ligand bağlanma bölgesi, lösin açısından zengin tekrar motifi; transmembran heliksi ve hücre içi TIR domaini. B) TLR1 - TLR2 - Pam₃CSK₄ kompleksinin yatay eksenli moleküler yapısı. C) TLR1 - TLR2 - Pam₃CSK₄ kompleksinin dikey eksenli moleküler yapısı. D) TLR1 - TLR2 - Pam₃CSK₄ kompleksinin yatay eksenli kristal yapısı. E) TLR1 - TLR2 - Pam₃CSK₄ kompleksinin içsel bağlanma bölgesinin kristal yapısı (Jin ve ark., 2007; Manavalan ve ark, 2011; Gao ve ark, 2017 kaynaklarından uyarlanmıştır).

Tablo 2.3: İnsandaki Toll Like reseptörlerinin genel özellikleri (Harsini ve ark., 2014; Isaza-Correa ve ark., 2014; Kanzler ve ark., 2007; Thakur ve ark., 2015; Khan ve ark., 2016; So ve Ouchi, 2010; Noreen ve Arshad, 2015).

TLR Çeşidi	Hücre ve Genom Bölgesi	Hücredeki Fonksiyonu	Eksprese Olduğu Hücre	Kanser çeşidinde artan değişim
TLR 1	Hücre yüzeyi 4p14	•Lipopeptidler için reseptör	•Miyeloid hücreler •NK, T ve B hücreleri •Endotel, Epitel hücreleri •Keratinositler	•Multipl miyelom (Abdi ve ark., 2013; Abdi ve ark., 2014) •Meme kanseri (Chan ve ark., 2012)
TLR 2	Hücre yüzeyi 4q32	•Lipopeptidler için reseptör	•Miyeloid hücreler •NK, T ve B hücreleri •Endotel, Epitel hücreleri •Keratinositler	•Kolon kanseri (Yoshioka ve ark., 2001) •Laringeal karsinom (Wang ve ark., 2013; Szczepański ve ark., 2007) •Kolon kanseri (Furrie ve ark., 2005) •Yumurtalık kanseri (Chefetz ve ark., 2013) •Mide kanseri (Chang ve ark., 2004; Tye ve ark., 2012) •Baş ve boyun yassı hücreli karsinom (Nomi ve ark., 2010) •Multipl miyelom (Abdi ve ark., 2013; Abdi ve ark., 2014)
TLR 3	Endozom 4q35	•IFN- α/β ve IL-12p70 üretimini uyarır	•Miyeloid hücreler •NK ve T hücreleri •Endotel, Epitel hücreleri •Keratinositler •Nöronlar	•Melanom (Salaun ve ark., 2007) •Kolon kanseri (Furrie ve ark., 2005) •Özofagus skuamöz hücreli karsinom (Sheyhidin ve ark., 2011) •Meme kanseri (González-Reyes ve ark., 2011; Salaun ve ark., 2006) •Akciğer kanseri (Samara ve ark., 2012) •HPV-pozitif Rahim ağzı kanseri (DeCarlo ve ark., 2011) •Baş ve boyun yassı hücreli karsinom (Nomi ve ark., 2010) •Prostat kanseri (Paone ve ark., 2008)

TLR 4	Hücre yüzeyi 9q32–q33	•CD4+ T hücrelerinin proliferasyonunu uyarır	•Miyeloid hücreler •NK ve T hücreleri •Endotel, Epitel hücreleri •Keratinositler •Mast hücreleri	•Melanom (Molteni ve ark., 2006) •Meme kanseri (González-Reyes ve ark., 2011; Rajput ve ark., 2013) •Kolon kanseri (O'Leary ve ark., 2012) •Özofagus skuamöz hücreli karsinom (Sheyhidin ve ark., 2011) •Yumurtalık kanseri (Kelly ve ark., 2006) •Mide kanseri (Schmausser ve ark., 2006; Chochi ve ark., 2008) •Akciğer kanseri (Zhang ve ark., 2008; He ve ark., 2020) •Jinekolojik kanserler (Kim ve ark., 2007)
TLR 5	Hücre yüzeyi 1q41–q42	•Romatoid artritte TNFα'nın transkripsiyonunu modüle eder	•Miyeloid hücreler •NK, T hücreleri •Endotel, Epitel hücreleri •Keratinositler	•Kolon kanseri (Rhee ve ark., 2008) •Mide kanseri (Schmausser ve ark., 2006) •Rahim ağzı kanseri (Kim ve ark., 2007)
TLR 6	Hücre yüzeyi 4p14	•NFκB'yi aktive eder •B hücrelerinde antikor sekresyonunu ve sitokini artırır	•Miyeloid hücreler •T ve B hücreleri •NK hücreleri •endotel hücreleri •Epitel hücreleri •Keratinositler	•Meme kanseri (Chan ve ark., 2012)
TLR 7	Endozom Xp22.3	•NFκB'yi aktive eder •Sinir dokusunun inflamasyonuna aracılık eder	•Miyeloid hücreler •T ve B hücreleri •NK hücreleri •endotel hücreleri	•Özofagus skuamöz hücreli karsinom (Sheyhidin ve ark., 2011)

TLR 8	Endozom Xp22	•Proliferasyonu, hayatta kalma ve hücre farklılaşmasını artırır	•Miyeloid hücreler •NK hücreleri •Endotel hücreleri	•Rahim ağzı kanseri (Zhang ve ark., 2014)
TLR 9	Endozom 3p21.3	•Gram pozitif bakterilerin peptidoglikanına hücrel tepkileri modüle eder	•Miyeloid hücreler •T ve B hücreleri •NK hücreleri •Endotel hücreleri •Epitel hücreleri •Keratinositler	•Meme kanseri (Merrell ve ark., 2006; González-Reyes ve ark., 2011) •Rahim ağzı kanseri (Lee ve ark., 2007) •Akciğer kanseri (Zhang ve ark., 2008) •Prostat kanseri (Ilvesaro ve ark., 2007; Väisänen ve ark., 2011) •Mide kanseri (Chang ve ark., 2004; Schmausser ve ark., 2006) •Hepatoselüler karsinom (Shiraki ve ark., 2010) •Özofagus skuamöz hücreli karsinom (Sheyhidin ve ark., 2011) •Beyin kanseri (Andaloussi ve ark., 2006) •Kronik lenfositik lösemi (Własiuk ve ark., 2012)
TLR 10	Hücre yüzeyi 4p14	•Lipopeptidler için reseptörler	•Miyeloid hücreler •T ve B hücreleri •Endotel hücreleri •Epitel hücreleri	•Nazofarenks karsinomu (Zhou ve ark., 2006)

2.2.3. Toll Like Reseptörleri ve Ligand Etkileşimi

TLR'ler çeşitli ligandlara duyarlı üç modüllü glikoprotein reseptörlerdir. N-terminal domain (ekto domain) ligand tanınmasında görevli içbükey yüzeyli yapıyı oluşturmaktadır (Narayanan ve Park, 2015). Reseptör yapısının evrimsel korunumuna rağmen farklı TLR'ler yapısal olarak bağımsız ligandlara duyarlıdır (Akira ve Takeda, 2004). Hücre yüzeyindeki reseptörler bakteriyel, fungal ve protozoan patojenleri eksternal moleküller aracılığıyla, hücre içindeki reseptörler viral patojenleri nükleik asitler aracılığıyla tanımaktadır (Kanzler ve ark., 2007).

Eksojen olarak mikrobiyal kaynaklı PAMP'lar, endojen olarak doku hasarı kaynaklı DAMP'lar kullanılmaktadır. PAMP için flagelladan flagellin proteini, gram-pozitif bakterilerden lipoteikoik asit (LTA) ve peptidoglikan, gram-negatif bakterilerden lipopolisakkaritler, mikobakterilerden lipoarabinomannan, lipopeptidler, lipoglikanlar ve lipomannanlar, mayadan zimosan, virüslerin çift sarmallı RNA'sı (double strand RNA, dsRNA), virüs ve bakteri DNA'sı örnek verilebilir. DAMP için plazma membran bileşenleri, Hyaluronan ve fibrinojen gibi hücre dışı matris bileşenleri, ısı şok proteinleri gibi sitozolik proteinler, mitokondriyal DNA (mtDNA) gibi hasar görmüş/parçalanmış organel içerikleri örnek verilebilir (El-Zayat ve ark., 2019).

Doğal TLR ligandları evrimsel olarak korunmuş moleküler modellerden oluşmaktadır. Birçok ligand kaynak aldığı organizmanın hayati fonksiyonlarıyla ilişkili olduğu için mutasyonlara bağlı değişme oranları çok düşüktür (Khan ve ark., 2016). Doğal ligandlara farklı derecelerde benzerliğe sahip sentetik ligandlar da tanımlanmıştır. Optimize farmakolojik özelliklere sahip çeşitli sentetik versiyonlar incelenmektedir (Brenner ve Bruserud, 2019; Kang ve ark., 2009; Müller ve ark., 2017; Yu ve ark., 2014). Doğrudan özgün TLR uyarımını yapan formlar agonist, reseptörde özgün ligandla bağlanma yarışına girerek etkileşimi engelleyenler antagonist olarak tanımlanmaktadır. Hâlihazırda kanser tedavisi için onay alan örnekleri mevcuttur (Kanzler ve ark., 2007).

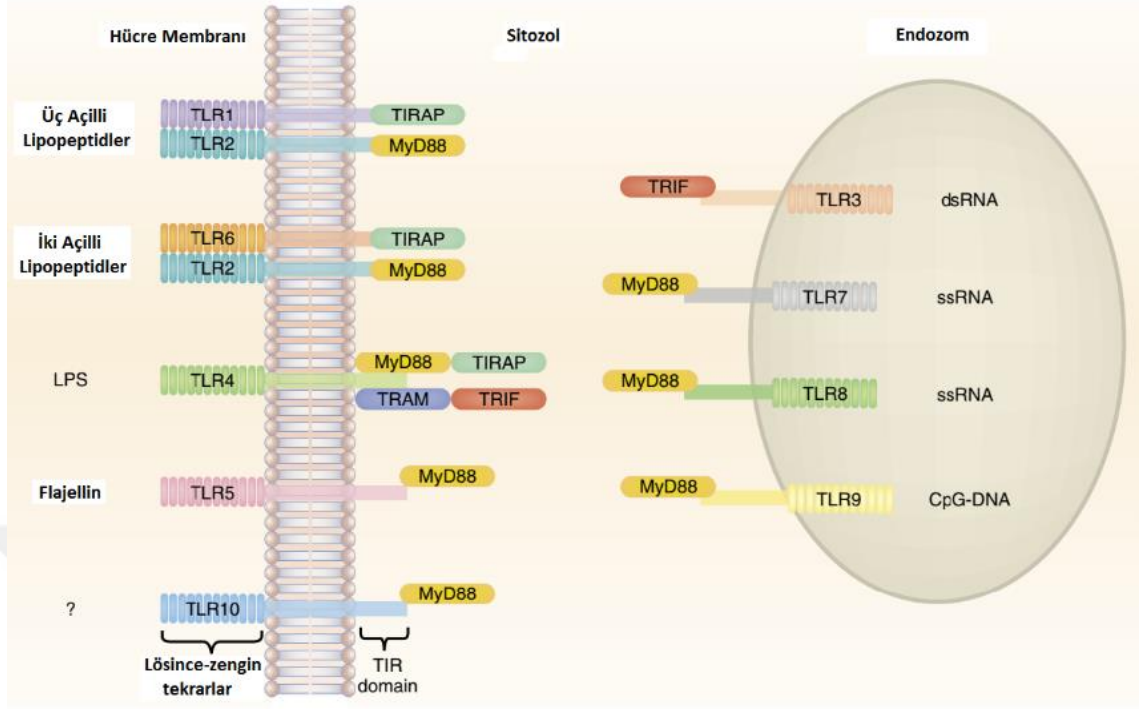
TLR'ye ligand bağlanması toll IL-1 reseptör (Toll-interleukin 1 receptor, TIR) domaininde görevli adaptör proteinlerin toplanmasını sağlar (Şekil 2.4). Bu domain ortak olarak MyD88, toll IL-1 reseptör domaini içere adaptör protein (Toll-interleukin 1

receptor domain-containing adapter protein TIRAP), IFN- β indükleyen TIR domaini içeren adaptör protein (TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN- β , TRIF) ve TRIF ile ilişkili adaptör molekül (TRIF-related adaptor molecule, TRAM) adaptörlerini içerir (Kanzler ve ark., 2007). MyD88, TLR2, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8 ve TLR9 sinyal kaskadı için gereklidir. TIRAP aktivasyonu MyD88'e bağlı olup, TLR2 ve TLR4 ile ilişkilidir. TRIF, TLR3 ve TLR4 aktivasyonunu takiben sinyal iletiminde MyD88'den bağımsızdır. TRAM, MyD88'den bağımsız/TRIF'e bağımlı bir şekilde TLR4 sinyaline aracılık eder (Isaza-Correa ve ark., 2014). Kullanılan adaptörün niteliğine bağlı olarak çeşitli kinazlar (IRAK1, IRAK2 ve IRAK4 ve Tümör-Nekroz Faktör Reseptörü İlişkili Faktör 6 (Tumor-Necrosis Factor-Receptor-Associated Factor 6, TRAF6) gibi bir dizi sinyal transdüksiyon molekülleri etkinleştirilir (Lim ve Staudt, 2013). Farklı reseptörler ve hücre tipine özgü sinyal yolunda diferansiyel adaptör kullanımı birçok varyasyona yol açar. Hücre farklılaşması, proliferasyon veya apoptoz gibi yanıtlar, hücre tipine, kantitatif / kalitatif TLR-ligand etkileşimine göre belirlenir (Kanzler ve ark., 2007).

TLR ligandları ile stimülasyonun en muhtemel sonucu enflamatuvar yanıt yolunun anahtar düzenleyicisi olan NF κ B'nin aktivasyonudur. Ayrıca tip I interferon, p38 mitojenle aktive edilmiş protein kinazlar (mitogen-activated protein kinase, MAPK) ve c-Jun NH2-terminal kinaz (JNK) MAPK yolları ile aktifleştirilebilir (Takeuchi 2004). Söz konusu sinyal yolları aracılığıyla IFN, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 pro-inflamatuvar sitokinlerinin ve birçok farklı kemokinin indüksiyonu gerçekleşir (Kanzler ve ark., 2007).

2.2.4. Toll Like Reseptörleri Sinyal İletimi

TLR'lerin sinyal yolu çeşitli sitoplazmik adaptör moleküller tarafından yürütülür. Bunlar: (1) MyD88; (2) MyD88-adaptör benzeri protein (MyD88-adaptor-like protein, MAL); (3) TRIF; (4) TRAM. Bu adaptörler MyD88 ve TRIF bağımlı iki ana sinyal yolunda kullanılır. Alt sinyal iletimleriyle MAPK, transkripsiyon faktörleri NF κ B ve IFN düzenleyici faktör 3'ün (IFN regulatory factor 3, IRF3) aktivasyonu gerçekleştirilir. Nihayetinde TLR'lerin uyarıcı bileşenlerle etkileşimi, interferonların, pro-enflamatuvar sitokinlerin (IL-1, IL-6 ve TNF- α), kemokinlerin ve eşlenik stimülatör moleküllerin regülasyonu ile sonuçlanır (Şekil 2.5) (Harsini ve ark., 2014).

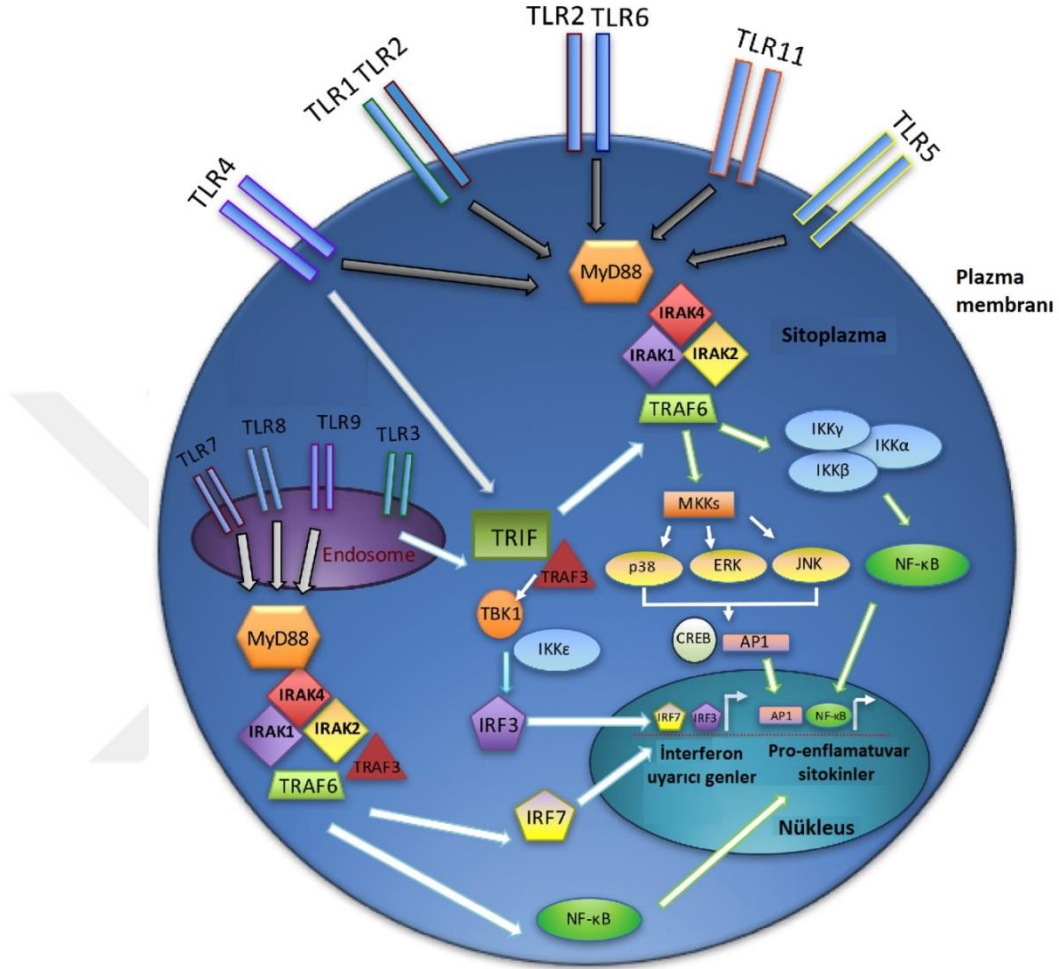


Şekil 2.5: İnsandaki Toll Like Reseptörlerini, adaptörlerini, hüresel oryantasyonunu ve ligand örneklerinin diyagramı (Kanzler ve ark., 2007 kaynağından uyarlanmıştır).

2.2.4.1. MyD88 Bağımlı Sinyal Yolu

MyD88, TLR3 dışında tüm TLR'ler tarafından aktive edilen evrensel adaptördür. MAPK ve NFκB'nin aktivasyonuna yol açar. TLR 5, 7, 8, 9 ve 11 doğrudan 1, 2, 4 ve 6 çeşitleri MAL sinyal aracısını kullanarak MyD88'e bağlı yolu başlatır. MyD88 sinyal yolu büyük ölçüde IL-1R ilişkili kinazlar, transforme edici aktiflenmiş büyüme faktörü-b kinaz 1 (transforming growth factor-b activated kinase 1, TAK1), TAK1 bağlayıcı protein 1 (TAK1-binding protein 1, TAB1), TAK1 bağlayıcı protein 2 (TAK1-binding protein 2, TAB2) ve tümör-nekroz faktör reseptörü ilişkili faktör 6 (tumor-necrosis factor-receptor-associated factor 6, TRAF6) sinyal aracılarını kullanarak etkinlik gösterir (Harsini ve ark., 2014). MyD88 aktivasyonu sonrasında IL-1 reseptörü ile ilişkili kinaz 4 (Interleukin-1 receptor-associated kinase 4, IRAK4) ile kompleks oluşturur ve devamında diğer IRAK ailesi üyeleri eklenerek (IRAK1 ve IRAK2) "Myddosome" kompleksi biraraya gelir. IRAK1, TRAF6 ile etkileşime girer. TRAF6, TAK1'in aktivasyonu ile NFκB ve MAPK

sinyal yollarını aktive eder. Böylelikle çeşitli proinflatuar sitokinlerin (örn., IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF α) ekspresyonu sağlanır (Şekil 2.5) (Monlish ve ark., 2016).



Şekil 2.6: TLR ligandları ve TLR sinyal iletim yolları. Hücre yüzeyinde (1, 2, 4, 5, 6, 10 ve 11) ve içinde (3, 7, 8 ve 9) bulunan TLR'ler özgün PAMP'larını tanır ve TLR sinyal basamaklarını etkinleştirirler (Monlish ve ark., 2016 kaynağından uyarlanmıştır).

2.2.4.2. Toll İnterlökin 1 Reseptör Domaini İçeren Adaptör Proteine Bağlı Sinyal Yolu

TLR3, MyD88'den bağımsız olarak işlev görür ve adaptör protein olarak TRIF kullanır. TRIF, tümör-nekroz faktör reseptörü ilişkili faktör 3'e (tumor-necrosis factor-receptor-associated factor 3, TRAF3) bağlandıktan sonra inhibitör kappab kinaz (Inhibitor kappab kinase, IKK) ile ilişkili kinazlar üzerinden IRF3'ü aktifleştirir ve tip I interferonların üretimini uyarır. Bunlara ek olarak TRIF, TRAF6 ile etkileşime girerek MyD88'den

bağımsız şekilde NFκB ve MAPK sinyal yollarını aktive eder. TLR4 özgün biçimde MyD88 ve TRIF bağımlı yolları kullanır (Şekil 2.5) (Monlish ve ark., 2016).

2.2.5. Toll Like Reseptörü 1/2 Ligand Etkileşimi ve Sinyalizasyonu

TLR2, çok sayıda ve yapısal olarak çeşitli moleküler bileşenlere duyarlılık göstermektedir (Steinhagen ve ark., 2011). Temel özelliği, hücre yüzeyinde TLR1 ve TLR6 ile heterodimerler oluşturma yeteneğidir. Triaçile lipopeptitleri tanımak için TLR1 ile, diaçile lipopeptitleri tanımak için TLR6 ile biraraya gelmektedir. Heterodimerleşme yalnızca tanıyabildiği ligand aralığını arttırmakla kalmaz, aynı zamanda hücre içinde etkilediği sinyal yollarını da çeşitlendirmektedir (Park ve ark., 2017). Son araştırmalarda TLR2'nin TLR10 ile heterodimer oluşturduğu gösterilmiştir. Söz konusu form TLR2/TLR1'ye benzer ligandlara duyarlı olup, işlev ve sinyal yoluna yönelik araştırmalar devam etmektedir (Paveljšek ve ark., 2021).

TLR heterodimerler için çeşitli agonistler tanımlanmıştır. Doğal formda peptidoglikanlar, lipopolisakkaritler, polisakkaritler, glikosil fosfatidil inositol bağlantılı yapılar bulunmaktadır (Steinhagen ve ark., 2011). Sentetik formda TLR2/TLR1 heterodimeri için Pam₃CSK₄ lipoproteini, TLR2/TLR6 heterodimeri için Pam₂CSK₄ lipoproteini geliştirilmiştir. Benzer olan bu agonistlerde ayırt edicilik TLR1'in hidrofobik kanala sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Bu kanal sayesinde lipoproteindeki üçüncü asetillenmiş zinciri bağlanmaktadır (Jin ve ark., 2007; Kang ve ark., 2009).

TLR2 / TLR1 heterodimerleri ligand etkileşimi öncesinde hem hücre içinde hem de plazma zarında lipid salları içinde bulunur. Pam₃CSK₄ ligand bağlanma alanı lipit cepte bulunmaktadır. Bu yapı lösin zengin dışbükey bölgede merkezi ve C-terminal domainler arasında yer almaktadır (Brodsky ve Medzhitov, 2007). Agonist bağlanmasıyla, TLR2/1'in hücre dışındaki C-terminal domainleri "n" şeklinde konformasyona, hücre içindeki N-terminal domainleri "m" şeklinde konformasyona geçmektedir (Caplan ve Maguire-Zeiss, 2018).

TLR2/1 heterodimerlerine ligand bağlanması gerçekleştiğinde plazma zarından nükleusa doğru TIR domainleri aracılığıyla sinyal kaskadı başlatılır. Ligand aktivasyonu

sonrasında NFκB ve MAPK sinyal yolları kullanılır (Paveljšek ve ark., 2021). İlk aşamada IRAK kompleksinin kinaz aktivitesini uyaran MyD88 bağımlı yanıt oluşur. IRAK kompleksi sırayla TRAF6 K63 ve K29'a bağılı ubikitinasyonu etkinleştirir (Caplan ve Maguire-Zeiss, 2018). Böylelikle NFκB aktivasyonu için IKK'lar serbest kalır ve MAPK sinyal yolu için TAK1 aktifleştirilir. Sonuçta pro-inflamatuar sitokinlerin üretimi için NFκB, AP-115, JNK ve p38 transkripsiyon faktörlerinin nükleer translokasyonu sağlanır (Park ve ark., 2017). Diğer taraftan, reseptör kompleksi endositozla içselleştirilerek endo-lizozomal bölümlere yönlendirilir (Dietrich ve ark., 2010; Triantafilou ve ark., 2006). Bu sayede MyD88-IRF1 ve IRF7'ye bağılı sinyal yolları aracılığıyla interferon- β indüklenir ve tip I interferon yanıtı oluşturulur (Oosenbrug ve ark., 2020) (Şekil 2.6).

2.2.6. Toll Like Reseptörleri 1/2 ve Hücre Apoptozu

Organizma bütünlüğünün ve homeostazının korumasında hücre canlılığının düzenlenmesi önemli rol oynar. Bu bağlamda apoptoz, hücre ölümüne yol açan kontrollü bir intihar programıdır. Apoptoz süreci özgün sinyaller aracılığıyla başlatılır ve sistein proteaz ailesi olan kaspazların sıralı aktivasyonu ile yürütülür (López ve ark., 2003). İki ana apoptotik yol tanımlanmıştır: "dışsal yol" ölüm reseptörüne ligasyon sonrası devreye girer ve kaspaz 8 aracılığıyla başlatılır, "içsel yol" hücrede DNA hasarı sonrasında mitokondriyal membran depolarizasyonu gelişerek CytC salınımı olur ve kaspaz 9 aracılığıyla başlatılır (Salaun ve ark., 2006).

TLR reseptör aktivasyonunun apoptoza neden olduğu çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir (Salaun ve ark., 2006). Enfektif bakteriyel patojenlerin konakçı immün yanıtına müdahale için TLR sinyaline dayalı sitotoksik stratejiler geliştirdiği bilinmektedir. En bilinen örnek enfekte makrofajlarda apoptozu tetikleyen vebanın etiyolojik ajanı gram-negatif bakteri *Yersinia Pestis*'tir. Yapılan araştırmalarda, söz konusu pro-apoptotik yanıtta TLR'lerin rolü gösterilmiştir. *Y. Pestis*, hücrede NFκB aktivasyonunu azaltarak hassas pro ve anti-apoptotik sinyal dengesini bozar ve enfekte makrofajları TLR'ye bağılı apoptoza yönlendirir. NFκB inhibisyonu, spesifik virülans proteini olan *Yersinia* dış protein P (*Yersinia* outer protein P, YopP) ile gerçekleşir. YopP makrofaj sitoplazmasında NFκB'yi

aktive eden kinazını bağlayarak inhibe eder. Daha sonra NFκB aktivasyonu engellenir ve makrofaj apoptozunun başlamasına yol açar. *Y. Pestis*'in TLR2 ve TLR4'ü aktive edebilmesine rağmen, sadece TLR4 sinyalinin makrofaj apoptozunu indüklediği belirlenmiştir (Ruckdeschel ve ark., 2004). TLR2'den ziyade TLR4'ün NFκB inhibisyonu ile hücre ölümüne yol açması farklı ekspresyon oranlarıyla ilişkili olması muhtemeldir. Çünkü makrofajlarda TLR2, TLR4 ve TLR9 ekspresyon profilini inceleyen Juarez ve ark. (2010), TLR2'nin oldukça düşük olduğunu raporlamıştır (Juarez ve ark., 2010).

TLR sinyal yolunun pro-apoptotik yanıtındaki rolü MyD88 adaptör proteinine bağlıdır. Ancak Myd88'in aşırı ekspresyonu düşük düzeyde apoptozu indüklediği için apoptozdaki rolü indirekt olmaktadır (Salaun ve ark., 2006). MyD88, N-terminalinde ölüm domaini (death domain, DD) içermekte olup, aktifleşmesi sonrasında hem TLR sinyal yolu bileşenleriyle hem de dışsal apoptoz yolu bileşenleriyle etkileşim göstermektedir (Kaiser ve Offermann, 2005). Bunun için FADD ile kompleks oluşturmakta ve kaspaz 8'in aktivasyonuna yol açmaktadır (Salaun ve ark., 2006).

TLR2 apoptozla ilişkilendirilen ilk TLR üyesidir (Salaun ve ark., 2006). Diğer TLR'lerde olduğu gibi pro-apoptotik yanıt MyD88'in dışsal apoptoz sinyal yolunda FADD'a adaptör protein olarak bağlanmasıyla gelişmektedir. FADD merkezi bir adaptör olup karboksi ve amino terminallerinde özgün bölgelere sahiptir. FADD'ın C-terminalinde reseptör kompleksine bağlı DD, N-terminalinde kaspaz 8'e bağlı ölüm efektör domaini (death effector domain, DED) bulunmaktadır. Zimojenler olarak sentezlenmiş kaspazlar sınırlı proteoliz ile aktif enzimlere dönüşmektedir. Aktif kaspaz 8, alt kademedeki kaspazları etkileyerek apoptotik programı yürütmektedir (Aliprantis ve ark., 2000). Bunlardan en bilineni apoptozda efektör olarak kullanılan ortak ölüm proteazı Kaspaz 3 ve apoptotik degradasyonun başlıca yürütücüsüdür (Porter ve Jänicke, 1999).

TLR1/2 sinyal kaskadı hücrede NFκB aktivasyonunu sağlamaktadır. Hücrede NFκB aktivasyonu anti-apoptotik genlerin indüksiyonuyla hücre sağkalımını desteklemektedir (Ruckdeschel ve ark., 2004). Anti-apoptotik proteinler, pro-apoptotik proteinlerin aktivitesini engelleyerek canlılığı desteklemektedir. BCL2, BCLXL, BCLW, A1 ve

MCL1 anti-apoptotik proteinler, BIM, BAD, BID, HRK, NOXA, BAK ve BAX pro-apoptotik proteinler olarak öne çıkmaktadır. Anti-apoptotik proteinlerin yokluğunda, pro-apoptotik proteinler aktifleşerek mitokondriyal yolla içsel apoptozu etkinleştirir (Tahir ve ark., 2017). Böylelikle TLR aracılı apoptoz NFκB yolağı ile dengelenmektedir (Ruckdeschel ve ark., 2004). Nitekim MyD88 sonrasındaki NFκB aktivasyon inhibisyonunun apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir (Aliprantis ve ark., 2000). Diğer taraftan, MAPK'lar üç farklı alt sinyal yolu içermektedir (JNK, p38 ve ekstrasellüler sinyal düzenlenimli kinaz 1/2 (Extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK)). Bu yollar karşılıklı fosforilasyon ve aktivasyona dayalı bir sistem aracılığıyla birçok fizyolojik süreci kontrol etmektedir (Chen ve ark., 2014). Apoptozdaki rolü açısından p38 MAPK sinyal yolu TLR ile ilişkilendirilmekte olup, inflamatuvar sitokinler ve çevresel stresler tarafından aktive edilmektedir. Buna göre Kato ve ark. (2013), şiddetli periodontitle ilişkilendirilen gram-negatif *Actinobacillus* enfeksiyonunun apoptoz indüksiyon mekanizmasını incelemiştir. Elde ettikleri bulgulara göre, bakteri hücre duvarı bileşenlerinin TLR2 uyarımı yaptığı ve p38 MAPK sinyal yolundaki aktivitenin arttığı gözlenmiştir. TLR2 sinyal yolunun inhibe edilmesi p38 aktivasyonunun azalmasına, p38'in inhibisyonu ise apoptozun baskılanmasına neden olduğu bulunmuştur. Böylelikle hücre apoptozunda TLR2 ve p38 MAPK sinyal yolunun ortak etkinliği raporlanmıştır (Kato ve ark., 2013). Benzer şekilde, AML hastalarında TLR1/2 reseptör stimülasyonunun etkilerini değerlendiren Eriksson ve ark. (2017) terapötik amaçla kullanılabilecek apoptoz bulgularını elde etmiştir. Buna göre Pam₃CSK₄ agonisti ile TLR1/2 stimülasyonu kanser hücrelerinde p38 MAPK bağımlı kaspaz 3 aktivasyonu ile apoptoz tetiklemiştir. Böylelikle AML hastalığının tedavisinde yeni ve güçlü bir strateji ortaya konmuştur (Eriksson ve ark., 2017).

2.2.7. Toll Like Reseptörleri ve Multiple Miyeloma Hücrelerinde Ekspresyonu

TLR'lerin insan vücudundaki dağılımı kapsamlı şekilde incelenmiştir. Ekspresyonları ve çeşitlilikleri hücrelerin farklılaşma derecesine, tipine, alt grubuna ve yaşam döngüsüne göre değişmektedir (Ramzi ve ark., 2018). Birçok hücre çeşidinde varlıkları gösterilmiş olup, öne çıkanları kardiyak miyositler, dermal endotel hücreleri, bağırsak endotel hücreleri ve bağışıklık hücreleridir. Araştırmalar, konak savunmasında TLR'ler

aracılığıyla hücrelerin içsel ve dışsal bileşenlere duyarlılık göstererek doğrudan aktifleştirdiğini göstermiştir. Bağışıklık sisteminde TLR'nin transkripsiyonel ve translasyonel seviyede varlığı monositler, nötrofiller, makrofajlar, dendritik hücreler, T, B ve doğal öldürücü (natural killer, NK) hücrelerinde bildirilmiştir (Takeuchi ve Akira, 2001).

Bağışıklık sistemindeki çeşitli hastalıkların da TLR ekspresyonu açısından değerlendirmesi yapılmıştır. Özellikle non-Hodgkin lenfoma, AML, KML, MM gibi hematolojik kanserlerde, primer periferik kan ve kemik iliği örneklerinde, hastalığa özgü murin modellerde ve hücre hatlarında patolojiye bağlı değişimler gösterilmiştir (Sánchez-Cuaxospa ve ark., 2016).

MM primer hücrelerinde ve hücre hatlarında TLR çeşitliliği önemli bir araştırma alanıdır (Thakur ve ark., 2015). TLR ifadenmesi gerek mRNA gerekse protein düzeyinde yüksek heterojenite göstermekte olup hastalık patolojisiyle etkileşimleri bildirilmiştir. Nitekim MM hastalarında çok enfeksiyon gelişir ve patojenler TLR'ler aracılığıyla B hücrelerinin poliklonal aktivasyonunu indüklemektedir. Bu yüzden kemik iliği ortamında MM hücrelerinin hayatta kalması ve proliferasyonu için TLR reseptörlerinin aracılık etmesi muhtemeldir (Bohnhorst ve ark., 2006).

MM hücre hatlarında, sağlıklı bireylerde ve MM hastalarında TLR ekspresyon profilleri değerlendirilmiş ve önemli değişimler saptanmıştır (Ramzi ve ark., 2018). TLR'lerin primer miyelom hücrelerinde ve MM hücre hatlarında heterojen olarak eksprese edildiği ve ekspresyonlarının normal plazma hücrelerinden anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir (Abdi ve ark., 2013). Buna göre TLR ifadenmesini inceleyen Bohnhorst ve ark. (2006), sağlıklı donörlerin yarısında herhangi bir TLR'nin ifade edilmediğini, geri kalanının ise esas olarak TLR1 ve/veya B hücrelerine özgü, hücre içi sinyal domaini olmayan TLR homoloğu RP105'i ifade ettiğini bulmuştur. Çalışmadaki MM hücre hatlarında güçlü TLR ekspresyonu gözlemlenmesi MM patogenezinde TLR etkileşimiyle ilişkilendirilmiştir (Bohnhorst ve ark., 2006). Benzer şekilde TLR transkriptlerini inceleyen Xu ve ark. (2006), TLR2, TLR4 ve TLR9 ekspresyonunda anlamlı, TLR1, TLR6 ve TLR7 ekspresyonunda ise kantitatif artış saptamıştır. Akış sitometri analizinde

TLR4 ve TLR9 ekspresyonu anlamlı TLR2 ekspresyonu ise oransal düzeyde daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Çalışmadaki hücre hatlarında hastalarla ortak biçimde TLR4 ve TLR9'da anlamlı artış saptamıştır (Xu ve ark., 2010). Aynı örnek gruplarında değerlendirme yapan Abdi ve ark. (2013), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 ve TLR8 ekspresyonunun MM primer hücreleri ve hücre hatlarına kıyasla normal B hücrelerinde olmadığını belirlemiştir. Araştırmacılar söz konusu farklılığın B hücrelerinin malignan MM transformasyonundaki onkojenik değişikliklerden birisi olduğunu ifade etmiştir (Abdi ve ark., 2013).

Abdi ve ark. (2013) tarafından TLR ekspresyonunun transkripsiyonel ve translasyonel seviyede karşılaştırması mRNA ve protein varlığı arasında değişkenlik göstermiştir. TLR5 mRNA'sının varlığı tüm hücre hatlarında saptanmış ancak protein seviyesinde ekspresyonu saptanmamıştır. Söz konusu mRNA ve protein ekspresyonu arasındaki uyumsuz ilişki spesifik mRNA'nın düşük stabilitesinden ve özgün proteinin translasyon sürecindeki modifikasyonlarından kaynaklanabileceği ifade edilmiştir. Ayrıca araştırmada elde edilen sonuçlara göre Fravel, L363 ve U266 hücre hatları çok düşük seviyelerde TLR3 mRNA eksprese ederken, TLR3 proteini belirgin ölçüde ifade etmiştir. Protein seviyesinde, L363 hücre hattı TLR8 açısından, NCI-H929 hücre hattı ise TLR1, TLR3, TLR7, TLR9 açısından, RPMI 8226, Fravel ve U266 hücre hatları TLR4 açısından belirgin bir fark oluşturmuştur (Abdi ve ark., 2013; Abdi ve ark., 2014).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışmamıza ait tüm inceleme ve değerlendirmeler Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 02.08.2019 tarih ve 2019/9-267 numaralı onayıyla; Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında yapılmıştır.

3.1. Kullanılan Cihazlar

- Mikropipetler; 10µl, 100µl, 1000µl (ThermoScientific)
- Karbondioksitli inkübatör (Thermo Scientific)
- Inverted mikroskop (Leica)
- Laminar flow (Metisafe)
- Homojenizatör (Sonics)
- Isıtma bloğu (Stuart)
- Soğutmalı santrifüj (Thermo Scientific)
- Spin vorteks (Biosan)
- Vorteks (Biosan)
- Nanodrop (Thermo Scientific)
- PCR cihazı (SenQuest)
- RotorGene Real Time PCR cihazı (Qiagen)
- Buzdolabı +4°C -20°C (Arçelik)
- Derin dondurucu -80°C (Thermo Scientific)

3.2. Kullanılan Kimyasallar

- PBS (Gibco)
- Fetal Bovine Serum (Thermo)
- Besiyeri RPMI 1640 (Multicell)
- Penisilin/Streptomisin antibiyotik (Thermo)

- İksazomib (MLN2238, MCE, CAS 1072833-77-2)
- Karfilzomib (PR-171, MCE, CAS 868540-17-4)
- Venetoklaks (ABT-199, MCE, CAS 1257044-40-8)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Sigma)
- Fenil Metil Sülfonil Florid (PMSF) (Roche)
- Primerler (Qiagen)
 - GAPDH, IRAK4, MyD88, TRAF6 CASP3, BCL2, BCLXL ve MCL1
- Etanol (Sigma)
- Metanol (sigma)
- Hücre Lizis Solusyonu (CST)
- Amonyum Persülfat (Sigma)
- Tripure Isolation Reagent (Roche)
- TEMED (Sigma)
- Tris base (BioRad)
- Yağsız süt tozu (CST)
- ColorPlus Protein Belirteci (CST)
- Beta-Aktin antikor (CST)
- BCL2 antikor (CST)
- Sekonder antikor (CST)

3.3. Kullanılan Kitler

- Hücre Proliferasyon Kiti, Water Soluble Tetrazolium, WST-1 (Sigma)
 - RNA İzolasyon Kiti (Qiagen)
 - cDNA Sentez Kiti (Qiagen)
 - Taqman Master Kiti (Qiagen)
 - BCA Protein Tayin Kiti (Thermo)

3.4. U266, RPMI 8226 ve NCI H929 Hücre Hatları

Tez çalışmamızdaki, U266 hücre hattı İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyesi Prof.Dr. Yusuf BARAN'dan, RPMI 8226 ve

NCI H929 hücre hatları Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Asuman SUNGUROĞLU'dan temin edilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: U266, RPMI 8226 ve NCI H929 hücre hatlarının genel özellikleri (www.dsmz.de, Erişim tarihi: 26 Eylül 2022).

Hücre hattı	MM izolasyon evresi	MM hücre kaynağı	Ig üretimi	Hücre Karyotipi
U266	Tedavi sürecinde	Periferik Kan	IgE	Kompleks hipodiploid karyotip % 6.5 poliploidi 44(40-46)<2n>XY, -8, -10, -13, -15, +2mar, t(1;11)(p33;q13), add(3)(q27), t(4;11)(q?21;q23), add(7)(q32), add(8)(q24), add(9)(q34), add(10)(p14), add(14)(p11), add(17)(p11), add(18)(p12), der(22)t(15;22)(q21;q13) - 11q13
RPMI 8226	Teşhis sürecinde	Periferik Kan	IgG	Kompleks hipotriploid karyotip % 7.5 poliploidi 62-67<3n>XXY, -1, +5, +6, +7, -8, -9, -10, +11, -12, -13, -14, +16, +18, -19, +21, -22, der(1)t(1;1)(p36.3;q11-12), add(3)(q27-29)x2, del(4)(p14p15.4), der(5;6)(q10;p10)x1-2, del(5)(q32), del(6)(q15), add(9)(p24), add(11)(p15), del(11)(q25), der(14)t(1;14)(q11-12;q32)x2, del(15)(q11.2q14)x2, add(16)(q23-24), der(17)t(?8;17)(q21.2;q25), del(22)(q13.2) - der(1), 6q-, 14q+ ve 22q-
NCI H929	Relaps sürecinde	Plevral Efüzyon	IgA	Kompleks hipodiploid karyotip % 16 poliploidi 45(43-46)<2n>X, -X, +8, -10, -13, +mar, dup(1)(q11q25), del(1)(p11p25), del(6)(q25), der(8)t(8;?)(q23;?)x2, del(9)(p13), del(12)(p12)

3.5. Yöntemler

3.5.1. İlaç Stoklarının Hazırlanması

Karfilzomib (PR-171, MCE, CAS 868540-17-4), İksazomib (MLN2238, MCE, CAS 1072833-77-2) ve Venetoklaks (ABT-199, MCE, CAS 1257044-40-8) inhibitörleri temin edildi. Çözücü olarak DMSO kullanıldı ve ilaç stokları -80°C'de muhafaza edildi.

3.5.2. Toll Like Reseptörleri 1/2 Reseptör Ligandı Pam₃CSK₄ Stoklarının Hazırlanması

Pam₃CSK₄ (InvivoGen) reseptör ligandı temin edildi. Çözücü olarak steril saf su kullanıldı ve ligand stokları -20°C’de muhafaza edildi.

3.5.3. Hücre Kültür Ortamının Hazırlanışı

450 ml RPMI 1640 kültür ortamına 50 ml inaktif FBS, 5 ml 200 mM’lık L-Glutamin, 5 ml 100 µg/ml’lik Penisilin/Streptomisin eklendi.

3.5.4. Hücre Kültürü Uygulamaları

U266, RPMI 8226 ve NCI H929 hücreleri, %10 FBS içeren RPMI 1640 besi yerinde %95 nem ve %5 CO₂’li ortamda 37°C ayarlı inkübatörde kültüre edildi. NCI H929 hücrelerinin kültüründe besi ortamına 50 µM konsantrasyonda 2-mercaptoethanol ilave edildi.

3.5.5. Hücre Kültüründe Ligand Uygulaması

U266, RPMI 8226 ve NCI H929 hücreleri, Pam₃CSK₄ (InvivoGen) TLR1/2 reseptör ligandı ile 5 µg/ml konsantrasyonda 24 saat inkübe edilerek hücre stimülasyonu gerçekleştirildi. İnhibitör uygulanması öncesinde 3 defa PBS solüsyonu ile yıkama yapılarak kültür ortamındaki Pam₃CSK₄ (InvivoGen) uzaklaştırıldı.

3.5.6. Hücre Kültüründe İnhibitör Uygulaması

U266, RPMI 8226 ve NCI H929 hücre hatlarına normal ve Pam₃CSK₄ (InvivoGen) stimülasyonlu kültür koşullarında inhibitör deneyleri gerçekleştirildi. Karfilzomib (PR-171, MCE, CAS 868540-17-4), İksazomib (MLN2238, MCE, CAS 1072833-77-2) ve Venetoklaks (ABT-199, MCE, CAS 1257044-40-8) ile 24 saat inkübasyonunda tekil ve kombine ilaç uygulamasında değerlendirmeler yapıldı.

3.5.7. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

U266, RPMI 8226 ve NCI H929 hücreleri 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 5x10⁴ hücre/kuyu olacak şekilde dağıtıldı. CFZ, IXS ve VNT konsantrasyonları ile hazırlanmış

%10'luk RPMI 1640 besiyerinde 24 saat için 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde kültüre edildi. Protokol süresi sonunda her kuyuya %10 oranında WST-1 solüsyonu (Roche) eklendi ve formazan ürününün oluşturduğu absorbans 4 saat sonunda spektrofotometre ile 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Deneyler her bir konsantrasyon için iki bağımsız kültür yapılarak tekrarlandı. İnhibitörler için kullanılan dozlar Tablo 3.2'de verildi.

Tablo 3.2: U266, RPMI 8226 ve NCI H929 hücrelerinde normal ve Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında CFZ, IXS ve VNT inhibitör uygulama konsantrasyonları.

U266 - RPMI 8226 - NCI H929		
Karfilzomib	İksazomib	Venetoklaks
17,3 nM	18,0 nM	30,0 nM
34,5 nM	36,1 nM	60,1 nM
69,1 nM	72,1 nM	120,2 nM
138,2 nM	144,2 nM	240,4 nM
276,3 nM	288,5 nM	480,8 nM
552,7 nM	576,9 nM	961,5 nM
1105,4 nM	1153,8 nM	1923,1 nM

2.3.4. Hücrelerden Total RNA İzolasyonu

U266, RPMI 8226 ve NCI H929 hücrelerine deneysel ilaç dozları ve kombinasyonları 6 kuyulu kültür kaplarında 1x10⁶ hücre/kuyu olacak şekilde uygulandı. İnkübasyon süreleri sonunda RNA izolasyon kiti (Qiagen, Almanya; Cat. No: 74104) kullanılarak üretici firma protokolüyle total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon protokol aşamaları şunlardır:

- İzolasyon başlamadan önce alttaki bileşenler hazırlandı.
 - RNA, RNazlar'ların inaktivasyonu için 1ml RLT Plus Tampona 10 µl β-merkaptoetanol (β-ME) eklendi.
 - Yıkama solüsyonunun hazırlanması için RPE Tamponuna 4 hacim etanol (%96-100) eklendi.

2. Hücreler kültürden toplandı ve uygun hacimde Tampon RLT Plus eklenerek 30 saniye homojenize edildi.
3. Homojenize lizati, 2 ml'lik gDNA Eliminator spin kolonuna aktarıldı.
4. 30 saniye, $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) hızda santrifüjlendi. Kolonu atıldı ve çıkış hacmi toplandı. Hacme %70 etanol eklendi (350 μ l veya 600 μ l) ve pipetlenerek iyice karıştırıldı.
5. Herhangi bir çökelti dahil olmak üzere 700 μ l'ye kadar numuneyi, 2 ml'lik RNeasy spin kolonuna aktarıldı ve 15 saniye $\geq 8000 \times g$ 'de santrifüjlendi. Çıkış hacmi atıldı.
6. 2 ml'lik toplama tüpünde RNeasy Mini spin kolonuna 700 μ l Tampon RW1 eklendi ve 15 saniye $\geq 8000 \times g$ 'de santrifüjlendi. Çıkış hacmini atıldı..
7. RNeasy spin kolonuna 500 μ l Tampon RPE eklendi ve 15 saniye $\geq 8000 \times g$ 'de santrifüjlendi. Çıkış hacmi atıldı.
8. RNeasy spin kolonuna 500 μ l Tampon RPE eklendi ve 2 dakika $\geq 8000 \times g$ 'de (≥ 10.000 rpm) santrifüjlendi.
9. RNeasy spin kolonu yeni bir 1,5 ml toplama tüpüne yerleştirildi. Doğrudan spin kolon membranına 30–50 μ l RNaz içermeyen su eklendi ve RNA elusyonu için $\geq 8000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüjlendi.
10. Toplama tüpünde izole edilen RNA'larda Nanodrop cihazı ile miktar (ng/ μ l) ve saflık ölçümleri yapıldı.
11. Örnekler -80°C 'de muhafaza edildi.

2.3.5. Komplementer DNA (Complementary DNA, cDNA) sentezi

Elde edilen total RNA'lar, RT² HT First Strand cDNA sentez kiti (Qiagen, Almanya; Kat. No: 330411) ile cDNA'ya çevrildi. cDNA protokol aşamaları şunlardır:

1. Her RNA örneği için ayrı tüplerde 6 μ l Genomik DNA Eliminasyon (GE2) karışımı hazırlandı.
2. 500 ng RNA içeren örnek 8 μ l hacimde GE2 karışımına ilave edildi.
3. Tüpler 37°C 'de 5 dakika inkübe edildi ve hemen buz üzerine alındı.
4. 20 μ l'lik son hacim üzerine 6 μ l BC5 Ters Transkriptaz Karışımı eklendi.
5. Tüpler 42°C 'de 15 dakika ve devamında 95°C 'de 5 dakika inkübe edildi.

6. Her bir tüpe 91 µl RNaz içermeyen su (Qiagen, Almanya Kat No:1039498) eklendi ve pipetlenerek karıştırıldı.
7. Örnekler Real-Time PCR öncesi uzun süreli saklama için -20° C'lik bir dondurucuda stoklandı.

2.3.6. Gen İfade Düzeylerinin Real-Time PCR ile Ölçümü

Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase GAPDH), IRAK4, MyD88, TRAF6, CASP3, BCL2, BCLXL ve MCL1 genlerinin mRNA miktar kantitasyonları, Real-Time PCR yöntemi ile RotorGeneQ cihazı kullanılarak yapıldı. Amplifikasyonlar, 25 µL toplam tepkime haciminde cDNA, özgün primerler (Tablo 3.3) ve RT² SYBR Green Mastermix karışımı (Qiagen, Almanya; Kat. No:330500) kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 3.4). Genlerin ekspresyon kantifikasyonları için *GAPDH* mRNA düzeyi referans alındı.

Real-Time PCR karışımları 0.2 ml'lik PCR tüplerinde hazırlandı ve üzerlerine cDNA'lar eklendi. Tüpler cihaza yerleştirildikten sonra Tablo 3.5'te belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak reaksiyon gerçekleştirildi. *GAPDH, IRAK4, MyD88, TRAF6, CASP3, BCL2, BCLXL ve MCL1* genleri için aynı program kullanıldı. Reaksiyon sonucunda, genlerin mRNA düzeylerini gösteren Crossing point (Cp) değerleri belirlendi.

Gen ekspresyon sonuçlarının kantifikasyonu "Pfaffl" matematiksel denklemini kullanan Relative Expression Software Tool (REST 2006 V3, International University Line (IUL), La Jolla, CA, USA) programı ile yapıldı.

Tablo 3.3: Hedef genlere ait RefSeq ve RT² qPCR primer assay katalog numaraları.

Gen Adı	RefSeq (mRNA)	RT ² qPCR primer assay Gene Globe ID	Band Uzunluğu (bp)
IRAK4	NM_016123	PPH06036A-200	4303
MyD88	NM_002468	PPH00911B-200	2862
TRAF6	NM_004620	PPH00329B-200	7947
BCL2	NM_004050	PPH00081E-200	3621

BCLXL	NM_138578	PPH00082C-200	2575
MCL1	NM_021960	PPH00397E-200	4107
CASP3	NM_004346	PPH00107C-200	2689
GAPDH	NM_002046	PPH00150F-200	1421

* RefSeq sekansındaki ampikon pozisyonu.

Tablo 3.4: *GAPDH, IRAK4, MyD88, TRAF6, CASP3, BCL2, BCLXL ve MCL1* gen bölgeleri için kullanılan Real-Time PCR tepkime karışımı.

Bileşenler	Hacim
RT ² SYBR Green Mastermix	12,5 µl
cDNA	5 µl
RT ² qPCR Primer Assay (10µM stok)	1 µl
H ₂ O	6,5 µl
Total Hacim	25 µl

Tablo 3.5: *GAPDH, IRAK4, MyD88, TRAF6, CASP3, BCL2, BCLXL ve MCL1* genlerinin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR programı.

Döngü	Zaman	Sıcaklık
1	10 dakika	95°
40	15 saniye	95°
	1 dakika	60°

2.3.7. Total Protein İzolasyonu

U266, RPMI 8226 ve NCI H929 hücreleri $2,5 \times 10^6$ hücre/flask oranında inhibitörlerle inkübasyon sonrasında 1mM PMSF içeren RİPA buffer kullanılarak total protein izolasyonu gerçekleştirildi. Protokol aşamaları şunlardır:

1. İnhibitörlü besiyerleri 4000 rpm’de 10 dk santrifüjden sonra uzaklaştırıldı.
2. Pellet üzerlerine PBS verildi ve iyice homojenize edildi.
3. 8000 rpm’de 10 dk santrifüjden PBS santrifüj sonrasında uzaklaştırıldı.
4. 1mM PMSF içeren 1X RİPA Buffer’dan 200 µl eklendi.
5. Hücreler buz üzerinde 30 dk inkübasyona bırakıldı.
6. Hücreler inkübasyon sonrasında 2 tekrarlı olarak 15 sn sonikasyonda parçalandı.
7. Hücreler 12500 rpm’de 10 dk santrifüjden sonra süpernatant yeni tüplere alındı.
8. Protein örnekleri -80°C ’te saklandı.

2.3.8. BCA Kiti ile Protein Miktar Tayini

U266, RPMI 8226 ve NCI H929 hücrelerine inhibitör uygulamasında izole edilen proteinlerin miktar tayini BCA protein ölçüm kiti (Thermo Scientific, kat no. 23225) ile yapıldı. Protokol aşamaları şunlardır:

1. Bovine Serum Albumin (BSA) ile 2; 1,5; 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125; 0,025 ve 0 µg/ml konsantasyonlarda standart tüpler hazırlandı.
2. Kit Reaktifleri B:A oranı 1:50 olacak şekilde hazırlandı.
3. Protein örnekleri, 96 kuyucuklu plakaya 25’er µl eklendi.
4. Bu reaktif karışımından her bir kuyucuğa 200’er µl eklendi.
5. 37°C ’lik inkübatörde yarım saat inkübe edildi.
6. Süre sonunda mikrolaka ELISA okuyucuda 562 nm dalga ölçüldü.
7. Protein örneklerine bağlı absorbans değerlerinden denklem elde edildi.
8. Deneylerde izole edilen proteinlerin absorbans değeri belirlendi.
9. BSA ile elde edilen denklem kullanılarak protein miktarı hesaplandı.

2.3.9. Western Blot Yöntemi ile Protein Düzeylerinin Belirlenmesi

Hücrelerin inhibitör uygulamalarında izole edilen örneklerinde Kaspaz 3, Aktif Kaspaz 3, Bid ve Aktif Bid proteinlerinin Western blot yöntemi ile değerlendirmesi yapıldı. Analizlerde kontrol olarak β -aktin kullanıldı. Protokol aşamaları şunlardır:

1. Western blot yükleme jelleri Tablo 3.6'ya göre hazırlandı.
 - İlk olarak cam plak arasında seperasyon jeli hazırlandı.
 - Üst katmanda kabarcıkları engellemek için bütanol eklendi.
 - 20 dakikalık donma sonrasında toplama jeli hazırlandı.
 - Tarak kuyularda kabarcık oluşturmada cam plakalar arasına yerleştirildi.
2. Protein örnekleri hazırlandı.
 - Protein örneklerinin eş miktarları yükleme için belirlendi.
 - Proteinlerle aynı oranda 2X sample buffer eklendi.
 - Denatürasyon için 95°C'ye ayarlı ısıtıcı blokta 5 dk bekletildi.
 - Denatürasyon sonrasında buza alındı ve transfer boyunca tutuldu.
 - Protein örnekleri jele yüklendi.
3. Jeldeki örneklere hacimsel fark için 1X sample buffer eklendi.
4. Jel yürütmesinde dengeli protein dağılımı için 2 farklı derecede gerçekleştirildi.
 - İlk aşamada 70 Voltta 30 dakika çalışıldı.
 - İkinci aşamada 100 Voltta 60 dakika çalışıldı.
5. Jelde yürütülen örnekler PVDF membrana transfer edildi.
 - Jel bütünlüğü bozulmadan ıslak filtre kağıdına yerleştirildi.
 - Jelin açık olan yüzeyine metanolenmiş PVDF membran yerleştirildi.
 - PVDF membran üzerine diğer ıslak filtre kağıdı yerleştirildi.
 - Filtre kağıdı - jel - PVDF - filtre kağıdından oluşan blot seti süngerler arasına eklenerek transfer kasetine alındı.
 - Transfer kaseti transfer buffer içeren tanka dikey yerleştirildi.
 - Transfer işlemi 250 Miliamper'de 2 saat boyunca gerçekleştirildi.
6. Transferden çıkan membran hedef proteine özgü primer ve sekonder antikolarla işleme alındı.

- İlk olarak, Transferden çıkan membran 1X TBS'te 3 defa 5' süreyle çalkalayıcıda düşük sirkülasyonda yıkandı.
- İkinci olarak, 0.5gr süt tozu 10 ml TBS içeren çözeltide 2 saat blotlandı.
- Süre sonunda, 1X TBS'te 3 defa 5' süreyle çalkalayıcıda düşük sirkülasyonda yıkandı.
- Kaspaz 3, Aktif Kaspaz 3, Bid veya Aktif Bid proteinine özgü primer antikoru içeren solüsyon membran üzerine ilave edildi ve 14-16 saat +4°C'ta çalkalayıcıda düşük sirkülasyonda inkübe edildi.
- Süre sonunda, 1X TBS'te 3 defa 5' süreyle çalkalayıcıda düşük sirkülasyonda yıkandı.
- Primer antikora özgü sekonder antikoru içeren solüsyon membran üzerine ilave edildi ve 2 saat +4°C'ta çalkalayıcıda düşük sirkülasyonda inkübe edildi.
- Süre sonunda, 1X TBS'te 3 defa 5' süreyle çalkalayıcıda düşük sirkülasyonda yıkandı.
- Son aşamada membranın görüntülenmesi ChemiDoc MP (Biorad) sisteminde gerçekleştirildi.

7. Protein kantitasyonları, dansitometrik dijital analiz metodunu kullanan Image J 2013 V1.43 programı ile hesaplandı.

Tablo 3.6: Western blot seperasyon ve toplama jellerinin içeriği.

Bileşenler	Seperasyon Jeli	Toplama Jeli
Karışım Oranı	10%	5%
Total	5 ml	1,25 ml
D.Water	2.0 ml	850 µl
Tris buffer	1.25 ml (1.5 M, pH 8.8)	158 µl (0.5 M, pH 6.8)
Bis acrylamide	1.65 ml	208 µl
10% SDS	50 µl	12,5 µl
10% APS	50 µl	12,5 µl
TEMED	7,5 µl	3,8 µl

3.6. İstatistiksel Analiz

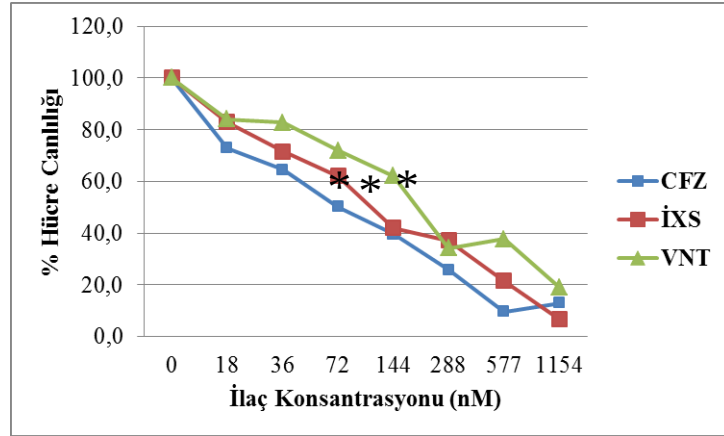
Hücre canlılık oranlarındaki ve Kaspaz 3, Aktif Kaspaz 3, Bid ve Aktif Bid proteinlerinin western blot değerlerindeki değişimler Statistical Package for Social Sciences (SPSS for Windows Release version 20, SPSS Inc. Headquarters, 223 S. Wacker Drive, 11th flor, Chicago, Illinois 60606) programı ile karşılaştırıldı. 0,05'den küçük olan p değerleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi. *GAPDH*, *IRAK4*, *MyD88*, *TRAF6*, *CASP3*, *BCL2*, *BCLXL* ve *MCL1* mRNA düzeylerindeki doza ve zamana bağlı değişimler Relative Expression Software Tool (REST 2006 V3, International University Line (IUL), La Jolla, CA, USA) programı ile karşılaştırıldı. 0,05'den küçük olan p değerleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

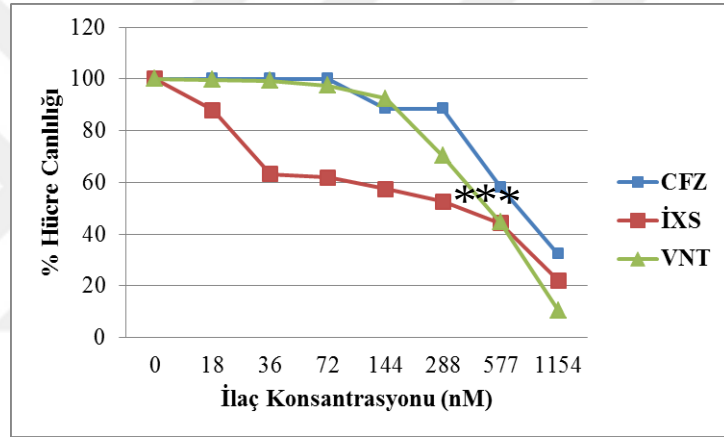
4.1. Hücre Canlılığı Sonuçları

CFZ, IXS ve VNT inhibitörlerinin tekil ve kombine uygulamalarıyla normal ve Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 24 saat inkübasyon sonucunda U266 (Şekil 4.1), RPMI 8226 (Şekil 4.2) ve NCI H929 (Şekil 4.3) hücre hatlarının canlılığında elde edilen IC₅₀ değerleri Tablo 4.1’de verildi. Değerlerin hem inhibitörler açısından hem de hücre hatları arasında heterojen olduğu gözlemlendi. Genel olarak normal kültür koşullarında elde edilen IC₅₀ değerlerinin Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarındaki eşleniklerine göre daha düşük olduğu saptandı. Diğer taraftan, inhibitörlerin kombine uygulamalarıyla elde edilen IC₅₀ değerlerinin tekil uygulamalarındaki eşleniklerine göre daha düşük olduğu saptandı.

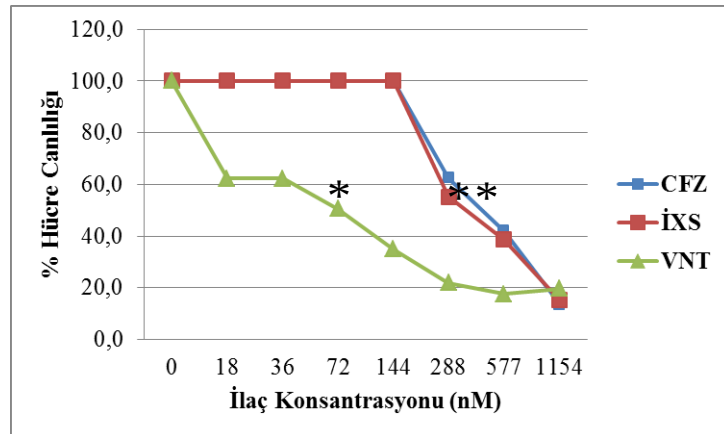
MM hücre hatları Pİ ve anti-apoptotik protein inhibitörlerine maruz bırakıldığında hücre ölümü artmaktadır. Hücreler Pam₃CSK₄ agonisti ile ön işleme alındığında canlılığı teşvik edici etki göstermesi beklenmektedir. Bu bağlamda Pam₃CSK₄ stimülasyonlu hücrelerde, proteazom inhibitörleri veya anti-apoptotik protein inhibitörünün artan dozlarında daha yüksek IC₅₀ değerleri elde edildi. Diğer taraftan Pam₃CSK₄ stimülasyonlu hücrelerde proteazom inhibitörleri ve anti-apoptotik protein inhibitörünün üçlü kombinasyonunda daha düşük IC₅₀ değerleri elde edildi. En düşük IC₅₀ değerleri: i) tek inhibitörlü normal kültür ortamı deneylerinde U266 hücre hattında CFZ ile 90,1 nM olarak, ii) tek inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür ortamı deneylerinde RPMI 8266 hücre hattında VNT ile kombine uygulamada 111,6 nM olarak, iii) kombine inhibitör uygulamalı Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür ortamı deneylerinde U266 hücre hattında IXS ile 54,4 nM olarak belirlendi. IC₅₀ değerleri kullanılarak U266, RPMI 8226 ve NCI H929 hücre hatlarında ileri analizde yapılacak mRNA kantifikasyon ve western blot deneyleri için son inhibitör konsatrasyonları tanımlandı. Bu amaçla Tablo 4.1’deki en düşük değerler esas alındı ve uygulamalarda mevcut değerden daha düşük konsatrasyon kullanıldı. Bu amaçla, U266, RPMI 8226 ve NCI H929 hücre hatlarında ileri deneylerde kullanılmak üzere CFZ inhibitörü için 50nM, IXS inhibitörü için 50nM ve VNT inhibitörü için 90nM konsatrasyonları belirlendi.



Şekil 4.1. U266 hücrelerinde (5000 hücre/kuyu) normal kültür koşullarında Karfilzomib, İksazomib ve Venetoklaks inhibitörleriyle 24 saat inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları *; $p < 0.05$.



Şekil 4.2. RPMI 8226 hücrelerinde (5000 hücre/kuyu) normal kültür koşullarında Karfilzomib, İksazomib ve Venetoklaks inhibitörleriyle 24 saat inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları *; $p < 0.05$.



Şekil 4.3. NCI H929 hücrelerinde (5000 hücre/kuyu) normal kültür koşullarında Karfilzomib, İksazomib ve Venetoklaks inhibitörleriyle 24 saat inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları *; $p < 0.05$.

Tablo 4.1: U266, RPMI 8226 ve NCI H929 hücrelerinde normal ve Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında Karfilzomib, İksazomib ve Venetoklaks inhibitörlerinin tekil ve kombine uygulamalarında elde edilen IC₅₀ değerleri (*; p<0,05).

Hücre Hattı	U266			RPMI 8226			NCI H929		
İnhibitör Çeşidi	CFZ	IXS	VNT	CFZ	IXS	VNT	CFZ	IXS	VNT
Tek İnhibitör Uygulaması	90, 1 nM *0,001	136,1 nM *0,001	203,5 nM *0,001	462 nM *0,005	373 nM *0,001	135,6 nM *0,001	793,8 nM *0,002	383,2 nM *0,001	919,8 nM *0,001
Pam₃CSK₄ ile Tek İnhibitör Uygulaması	274,6 nM *0,001	676,1 nM *0,001	261,4 nM *0,001	520,7 nM *0,007	414 nM *0,001	111,6 nM *0,001	835,4 nM *0,027	732,6 nM *0,001	1396,6 nM *0,031
Pam₃CSK₄ ile Kombine İnhibitör Uygulaması	57,5 nM *0,037	54,4 nM *0,001	94,7 nM *0,001	181,4 nM *0,001	151 nM *0,001	251 nM *0,001	629,1 nM *0,027	339,9 nM *0,007	567,1 nM *0,007

4.2. Gen İfade Düzeylerinin Sonuçları

U266, RPMI 8226 ve NCI H929 hücre hatlarında gen ekspresyonlarının değerlendirilmesi için RotorGeneQ cihazı kullanıldı. Hücrelerde *BCL2*, *BCLXL*, *CASP3*, *IRAK4*, *MCL-1*, *MyD88* ve *TRAF6* genlerinde mRNA ekspresyonları özgün primerler ve SYBR Green floresan boya kullanılarak incelendi. Elde edilen reaksiyon değerlerinin normalizasyonu için referans gen olarak (housekeeping) *GAPDH* kullanıldı. Rölatif gen ifadeleri “Pfaffl” matematiksel yöntemine dayalı analiz yapan REST 2006 V3 programı ile hesaplandı (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5).

CFZ 50nM, IXS 50nM ve VNT 90nM konsantrasyonlarında tekil (CFZ, IXS ve VNT) ve aynı konsantrasyonlarda kombine olarak (CFZ + VNT ve IXS + VNT), normal ve Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 24 saatlik inkübasyonla uygulandı. U266 hücre hattındaki mRNA düzeyindeki değişim değerleri Tablo 4.2 ve Tablo 4.3’te verildi. RPMI 8226 hücre hattındaki mRNA düzeyindeki değişim değerleri Tablo 4.4 ve Tablo 4.5’te verildi. NCI H929 hücre hattındaki mRNA düzeyindeki değişim değerleri Tablo 4.6 ve Tablo 4.7’de verildi.

MM hücrelerinde Pam3CSK4 agonisti ile TLR1/2 sinyal yolunu aktive eden stimülasyon gerçekleştirilmektedir. Bu durumda TLR1/2 sinyal yolunda görevli adaptör proteinlerin (IRAK4, MCL-1, MyD88 ve TRAF6) kullanılması ve mRNA düzeyinde artan değişimlerinin gözlenmesi beklenmektedir.

Aktifleşen TLR1/2 sinyal yolağının, transkripsiyon faktörü NFκB aktivasyonunu tetikleyerek hücrede anti-apoptotik proteinleri (BCL2 ve BCLXL) kullanması ve mRNA düzeyinde artan değişimlerinin gözlenmesi beklenmektedir. Diğer taraftan, Pİ’ler NFκB aktivasyonunu engelleyerek TLR1/2 sinyal yolağının NFκB yönlü ilerleyişini durdurmaktadır. Bu durumda TLR1/2 sinyal yolağı FADD ölüm reseptörü aracılığıyla apoptozu tetiklemektedir. Böylelikle anti-apoptotik proteinlerin (BCL2 ve BCLXL) azalan değişimleri ve apoptotik proteinlerin (CASP3) artan değişimleri mRNA düzeyinde gözlenmesi beklenmektedir. Ayrıca anti-apoptotik protein inhibitörü VNT’nin özgün şekilde BCL2 protein inhibisyonu sağlayarak ve apoptotik proteinlerin (CASP3) artan değişimlerinin mRNA düzeyinde gözlenmesi beklenmektedir.

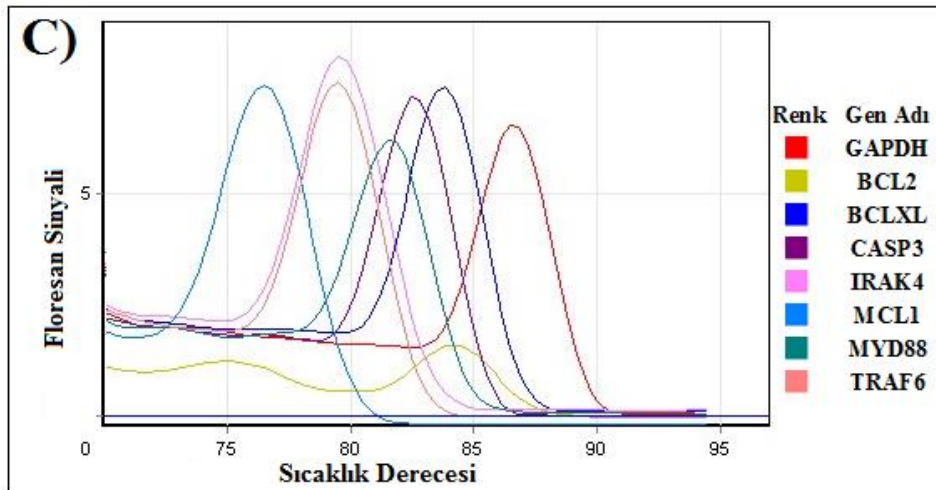
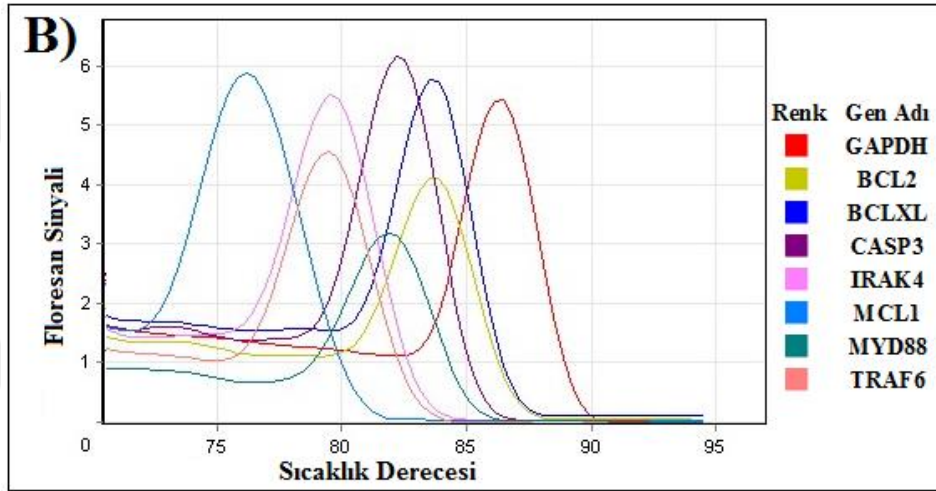
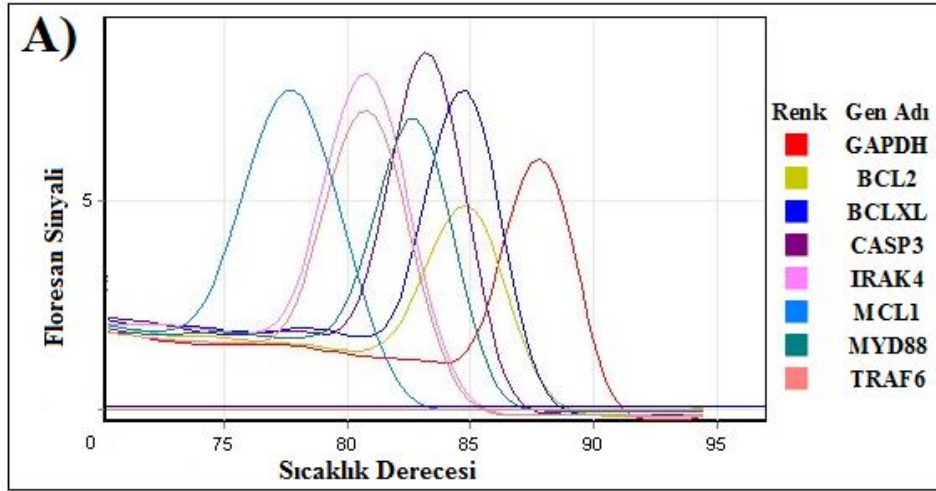
Sonuç olarak, proteazom inhibitörlü koşullara Pam₃CSK₄ stimülasyonunun ilave edilmesinin apoptoz oranını arttırması hedeflenmiştir. Ayrıca proteazom inhibitörlü koşullara Pam₃CSK₄ stimülasyonunun ilave edilmesinin yanısıra anti-apoptotik protein inhibitörü de ilave edilerek apoptoz oranının daha yüksek düzeye çıkarılması hedeflenmiştir.

4.2.1. BCL2 Geni İfade Düzeyi Sonuçları

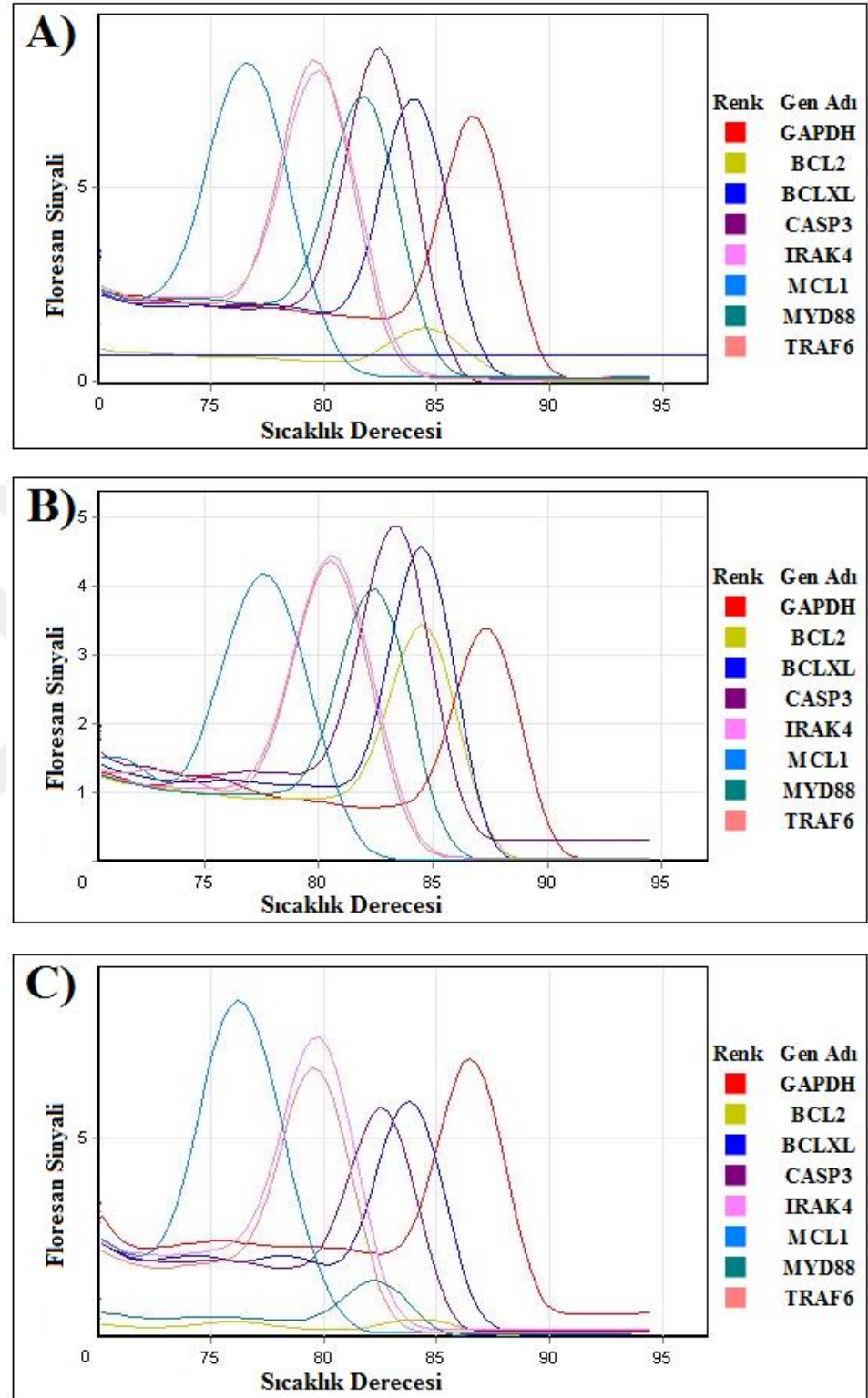
BCL2 geni ifade düzeyleri U266 hücre hattında, CFZ inhibitörlü normal kültür koşullarında 3 katlık artış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli normal kültür koşullarında 1,5 katlık artış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 9,6 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). IXS inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 0,6 katlık artış, IXS/VNT inhibitörü kombinli normal kültür koşullarında 0,9 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.2 ve Tablo 4.3).

BCL2 geni ifade düzeyleri RPMI 8226 hücre hattında, CFZ/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 2,6 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). IXS inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 0,1 katlık artış, IXS/VNT inhibitörü kombinli normal kültür koşullarında 3,7 katlık azalış, IXS/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 3,6 katlık azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.4 ve Tablo 4.5).

BCL2 geni ifade düzeyleri NCI H929 hücre hattında, inhibitörsüz Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 2,1 katlık artış, CFZ inhibitörlü normal kültür koşullarında 1,6 katlık artış, CFZ inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 4,1 katlık azalış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 1,5 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). IXS inhibitörlü normal kültür koşullarında 4,9 katlık azalış, IXS inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 2,1 katlık azalış, IXS/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 0,9 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.6 ve Tablo 4.7).



Şekil 4.4: U266, RPMI 8226 ve NCI H929 hücre hatlarında normal kültür koşullarında *BCL2*, *BCLXL*, *CASP3*, *IRAK4*, *MCL1*, *MyD88*, *TRAF6* ve *GAPDH* genlerine ait erime eğrileri. A) U266, B) RPMI 8226, C) NCI H929. Genlerin Melting Curve analizine ait sıcaklık dereceleri yatay eksen, floresan sinyalleri dikey eksen yer almaktadır.



Şekil 4.5: U266 RPMI 8226 ve NCI H929 hücre hatlarında Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında kontrol kültüründe *BCL2*, *BCLXL*, *CASP3*, *IRAK4*, *MCL1*, *MyD88*, *TRAF6* ve *GAPDH* genlerine ait erime eğrileri. A) U266, B) RPMI 8226, C) NCI H929. Genlerin Melting Curve analizine ait sıcaklık dereceleri yatay eksen, floresan sinyalleri dikey eksen yer almaktadır.

4.2.2. *BCLXL* Geni İfade Düzeyi Sonuçları

BCLXL geni ifade düzeyleri U266 hücre hattında, CFZ inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 5,2 katlık azalış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli normal kültür koşullarında 2,4 katlık azalış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 5,3 katlık azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). IXS inhibitörlü normal kültür koşullarında 3,6 katlık azalış, IXS inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 5,3 katlık azalış, IXS/VNT inhibitörü kombinli normal kültür koşullarında 3,9 katlık azalış, IXS/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 6 katlık azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.2 ve Tablo 4.3).

BCLXL geni ifade düzeyleri RPMI 8226 hücre hattında, inhibitörsüz Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 3,1 katlık artış, CFZ inhibitörlü normal kültür koşullarında 0,4 katlık artış, CFZ inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 0,8 katlık artış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 3,4 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). IXS inhibitörlü normal kültür koşullarında 0,2 katlık artış, IXS inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 0,5 katlık artış, IXS/VNT inhibitörü kombinli normal kültür koşullarında 0,4 katlık artış, IXS/VNT inhibitörü kombinli normal kültür koşullarında 2,5 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.4 ve Tablo 4.5).

BCLXL geni ifade düzeyleri NCI H929 hücre hattında, CFZ/VNT inhibitörü kombinli normal kültür koşullarında 2,5 katlık azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). IXS inhibitörlü normal kültür koşullarında 2,5 katlık azalış, IXS/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 3,4 katlık azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.6 ve Tablo 4.7).

4.2.3. *CASP3* Geni İfade Düzeyi Sonuçları

CASP3 geni ifade düzeyleri U266 hücre hattında, CFZ inhibitörlü normal kültür koşullarında 1,6 katlık artış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli normal kültür koşullarında

0,3 katlık azalış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarında 0,1 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). IXS inhibitörlü normal költür koşullarında 1,1 katlık azalış, IXS/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarında 2,3 katlık azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.2 ve Tablo 4.3).

CASP3 geni ifade düzeyleri RPMI 8226 hücre hattında, CFZ inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarında 1,3 katlık artış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarında 6,8 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). IXS inhibitörlü normal költür koşullarında 0,3 katlık artış, IXS inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarında 1,7 katlık artış, IXS/VNT inhibitörü kombinli normal költür koşullarında 0,5 katlık artış, IXS/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarında 5,6 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.4 ve Tablo 4.5).

CASP3 geni ifade düzeyleri NCI H929 hücre hattında, inhibitörsüz PAM₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarında 1,5 katlık artış, CFZ inhibitörlü normal költür koşullarında 1,6 katlık artış, CFZ inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarında 2,6 katlık artış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli normal költür koşullarında 0,1 katlık artış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarında 6 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). IXS inhibitörlü normal költür koşullarında 2,3 katlık artış, IXS inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarında 3,2 katlık artış, IXS/VNT inhibitörü kombinli normal költür koşullarında 1,7 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.6 ve Tablo 4.7).

4.2.4. IRAK4 Geni İfade Düzeyi Sonuçları

IRAK4 geni ifade düzeyleri U266 hücre hattında, inhibitörsüz Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarında 2,9 katlık azalış, CFZ inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarında 1 katlık azalış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli normal költür koşullarında 2,2 katlık azalış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarında 0,2 katlık azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). IXS inhibitörlü normal

kültür koşullarında 2,4 katlık azalış, IXS/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 3,3 katlık azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.2 ve Tablo 4.3).

IRAK4 geni ifade düzeyleri RPMI 8226 hücre hattında, inhibitörsüz Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 3,4 katlık artış, CFZ inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 3,2 katlık artış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli normal kültür koşullarında 1,5 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). IXS inhibitörlü normal kültür koşullarında 3,2 katlık artış, IXS inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 1,3 katlık artış, IXS/VNT inhibitörü kombinli normal kültür koşullarında 1,8 katlık artış, IXS/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 6 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.4 ve Tablo 4.5).

IRAK4 geni ifade düzeyleri NCI H929 hücre hattında, inhibitörsüz Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 1,5 katlık artış, CFZ inhibitörlü normal kültür koşullarında 0,1 katlık azalış, CFZ inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 0,1 katlık artış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli normal kültür koşullarında 2,2 katlık azalış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 2,1 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). IXS inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 1,7 katlık artış, IXS/VNT inhibitörü kombinli normal kültür koşullarında 1,3 katlık artış, IXS/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 0,9 katlık azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.6 ve Tablo 4.7).

4.2.5. *MCL1* Geni İfade Düzeyi Sonuçları

MCL1 geni ifade düzeyleri U266 hücre hattında, CFZ/VNT inhibitörü kombinli normal kültür koşullarında 1 katlık azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). IXS inhibitörlü normal kültür koşullarında 1 katlık azalış, IXS/VNT inhibitörü kombinli normal kültür koşullarında 1,1 katlık azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.2 ve Tablo 4.3).

MCL1 geni ifade düzeyleri RPMI 8226 hücre hattında, CFZ inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 2,4 katlık artış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli normal kültür koşullarında 1,3 katlık artış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 3,9 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). IXS inhibitörlü normal kültür koşullarında 1,6 katlık artış, IXS inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 1,4 katlık artış, IXS/VNT inhibitörü kombinli normal kültür koşullarında 1,6 katlık artış, IXS/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 5,7 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.4 ve Tablo 4.5).

MCL1 geni ifade düzeyleri NCI H929 hücre hattında, inhibitörsüz Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 3,6 katlık artış, CFZ inhibitörlü normal kültür koşullarında 0,8 katlık artış, CFZ inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 0,6 katlık artış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 3,8 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). IXS inhibitörlü normal kültür koşullarında 3,3 katlık artış, IXS inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 4,3 katlık artış, IXS/VNT inhibitörü kombinli normal kültür koşullarında 2 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.6 ve Tablo 4.7).

4.2.6. *MyD88* Geni İfade Düzeyi Sonuçları

MyD88 geni ifade düzeyleri U266 hücre hattında, inhibitörsüz Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 1,6 katlık artış, CFZ inhibitörlü normal kültür koşullarında 3,7 katlık artış, CFZ inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 2 katlık artış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli normal kültür koşullarında 0,1 katlık artış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 2,2 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). IXS/VNT inhibitörü kombinli normal kültür koşullarında 0,8 katlık azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.2 ve Tablo 4.3).

MyD88 geni ifade düzeyleri RPMI 8226 hücre hattında, CFZ inhibitörlü normal kültür koşullarında 3 katlık artış, CFZ inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında

3,1 katlık artış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarında 6 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). IXS inhibitörlü normal költür koşullarında 0,5 katlık artış, IXS inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarında 2 katlık azalış, IXS/VNT inhibitörü kombinli normal költür koşullarında 2 katlık artış, IXS/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarında 4,1 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.4 ve Tablo 4.5).

MyD88 geni ifade düzeyleri NCI H929 hücre hattında, inhibitörsüz Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarında 1,1 katlık azalış, CFZ inhibitörlü normal költür koşullarında 3 katlık artış, CFZ inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarında 2,5 katlık artış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli normal költür koşullarında 1,6 katlık artış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarında 4,9 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.6 ve Tablo 4.7).

4.2.7. TRAF6 Geni İfade Düzeyi Sonuçları

TRAF6 geni ifade düzeyleri U266 hücre hattında, inhibitörsüz Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarında 2 katlık azalış, CFZ inhibitörlü normal költür koşullarında 1,3 katlık artış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli normal költür koşullarında 0,4 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.2 ve Tablo 4.3).

TRAF6 geni ifade düzeyleri RPMI 8226 hücre hattında, inhibitörsüz Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarında 2,9 katlık artış, CFZ inhibitörlü normal költür koşullarında 4,1 katlık artış, CFZ inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarında 3,2 katlık artış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli normal költür koşullarında 1,7 katlık artış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarında 6,9 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). IXS inhibitörlü normal költür koşullarında 1,7 katlık artış, IXS inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarında 2,7 katlık artış, IXS/VNT inhibitörü kombinlinormal költür koşullarında 3,2 katlık artış, IXS/VNT inhibitörü kombinli normal költür koşullarında 5,9 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.4 ve Tablo 4.5).

TRAF6 geni ifade düzeyleri NCI H929 hücre hattında, inhibitörsüz Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 2,5 katlık artış, CFZ inhibitörlü normal kültür koşullarında 3,4 katlık artış, CFZ inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 0,1 katlık azalış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli normal kültür koşullarında 2,1 katlık artış, CFZ/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 4,3 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). IXS inhibitörlü normal kültür koşullarında 3,4 katlık artış, IXS inhibitörlü Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 2,5 katlık artış, IXS/VNT inhibitörü kombinli normal kültür koşullarında 2,3 katlık artış, IXS/VNT inhibitörü kombinli Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 0,7 katlık azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.6 ve Tablo 4.7).

Tablo 4.2: U266 hücre hattında normal ve Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında CFZ inhibitörünün tekil ve VNT ile kombine uygulamasında *BCL2*, *BCLXL*, *CASP3*, *IRAK4*, *MCL1*, *MyD88* ve *TRAF6* genlerinde gözlenen mRNA ekrespresyon değişimleri. Genlerin kantitasyonunda GAPDH mRNA ekrespresyon düzeyi esas alınarak normalizasyon sağlandı (*; p<0,05).

Kültür Çeşidi	BCL2	BCLXL	CASP3	IRAK4	MCL1	MYD88	TRAF6
Pam ₃ CSK ₄	-1,0	-2,1	-0,5	-2,9*	-1,5	1,6*	-2,0*
CFZ	3,0*	-2,2	1,6*	-1,4	-0,8	3,7*	1,3*
CFZ – Pam ₃ CSK ₄	0,0	-5,2*	0,4	-1,0*	-1,3	2,0*	0,0
CFZ – VNT	1,5*	-2,4*	-0,3*	-2,2*	-1,0*	0,1*	0,4*
CFZ – VNT – Pam ₃ CSK ₄	9,6*	-5,3*	0,1*	-0,2*	-1,5	2,2*	0,2

Tablo 4.3: U266 hücre hattında normal ve Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında IXS inhibitörünün tekil ve VNT ile kombine uygulamasında *BCL2*, *BCLXL*, *CASP3*, *IRAK4*, *MCL1*, *MyD88* ve *TRAF6* genlerinde gözlenen mRNA ekrespresyon değişimleri. Genlerin kantitasyonunda GAPDH mRNA ekrespresyon düzeyi esas alınarak normalizasyon sağlandı (*; p<0,05).

Kültür Çeşidi	BCL2	BCLXL	CASP3	IRAK4	MCL1	MYD88	TRAF6
Pam ₃ CSK ₄	-1,0	-2,1	-0,5	-2,9*	-1,5	1,6*	-2,0*
IXS	1,2	-3,6*	-1,1*	-2,4*	-1,0*	-1,4	-0,3
IXS – Pam ₃ CSK ₄	0,6*	-5,3*	-0,5	-1,6	-0,3	2,6	-1,1
IXS – VNT	0,9*	-3,9*	-1,8	-2,7	-1,1*	-0,8*	-0,8
IXS – VNT – Pam ₃ CSK ₄	-2,4	-6,0*	-2,3*	-3,3*	-1,8	-0,4	-0,8

Tablo 4.4: RPMI 8226 hücre hattında normal ve Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında CFZ inhibitörünün tekil ve VNT ile kombine uygulamasında *BCL2*, *BCLXL*, *CASP3*, *IRAK4*, *MCL1*, *MyD88* ve *TRAF6* genlerinde gözlenen mRNA ekrespresyon değişimleri. Genlerin kantitasyonunda GAPDH mRNA ekrespresyon düzeyi esas alınarak normalizasyon sağlandı (*; p<0,05).

Kültür Çeşidi	BCL2	BCLXL	CASP3	IRAK4	MCL1	MYD88	TRAF6
Pam ₃ CSK ₄	1,5	3,1*	3,6	3,4*	2,4	3,6	2,9*
CFZ	0,1	0,4*	0,3	3,5	2,8	3,0*	4,1*
CFZ – Pam ₃ CSK ₄	0,7	0,8*	1,3*	3,2*	2,4*	3,1*	3,2*
CFZ – VNT	-0,9	-0,7	-1,3	1,5*	1,3*	0,8	1,7*
CFZ – VNT – Pam ₃ CSK ₄	2,6*	3,4*	6,8*	4,9	3,9*	6,0*	6,9*

Tablo 4.5: RPMI 8226 hücre hattında normal ve Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında IXS inhibitörünün tekil ve VNT ile kombine uygulamasında *BCL2*, *BCLXL*, *CASP3*, *IRAK4*, *MCL1*, *MyD88* ve *TRAF6* genlerinde gözlenen mRNA ekrespresyon değişimleri. Genlerin kantitasyonunda GAPDH mRNA ekrespresyon düzeyi esas alınarak normalizasyon sağlandı (*; p<0,05).

Kültür Çeşidi	BCL2	BCLXL	CASP3	IRAK4	MCL1	MYD88	TRAF6
Pam ₃ CSK ₄	1,5	3,1*	3,6	3,4*	2,4	3,6	2,9*
IXS	-0,8	0,2*	0,3*	3,2*	1,6*	0,5*	1,7*
IXS – Pam ₃ CSK ₄	0,1*	0,5*	1,7*	1,3*	1,4*	-2,0*	2,7*
IXS – VNT	-3,7*	0,4*	0,5*	1,8*	1,6*	2,0*	3,2*
IXS – VNT – Pam ₃ CSK ₄	-3,6*	2,5*	5,6*	6,0*	5,7*	4,1*	5,9*

Tablo 4.6: NCI H929 hücre hattında normal ve Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında CFZ inhibitörünün tekil ve VNT ile kombine uygulamasında *BCL2*, *BCLXL*, *CASP3*, *IRAK4*, *MCL1*, *MyD88* ve *TRAF6* genlerinde gözlenen mRNA ekrespresyon değişimleri. Genlerin kantitasyonunda GAPDH mRNA ekrespresyon düzeyi esas alınarak normalizasyon sağlandı (*; p<0,05).

Kültür Çeşidi	BCL2	BCLXL	CASP3	IRAK4	MCL1	MYD88	TRAF6
Pam ₃ CSK ₄	2,1*	-0,3	1,5*	1,5*	3,6*	-1,1*	2,5*
CFZ	1,6*	-1,8	1,6*	-0,1*	0,8*	3,0*	3,4*
CFZ – Pam ₃ CSK ₄	-4,1*	-3,8	2,6*	0,1*	0,6*	2,5*	0,1*
CFZ – VNT	0,2	-2,5*	0,1*	-2,2*	-0,2	1,6*	2,1*
CFZ – VNT – Pam ₃ CSK ₄	1,5*	-2,3	6,0*	2,1*	3,8*	4,9*	4,3*

Tablo 4.7: NCI H929 hücre hattında normal ve Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında IXS inhibitörünün tekil ve VNT ile kombine uygulamasında *BCL2*, *BCLXL*, *CASP3*, *IRAK4*, *MCL1*, *MyD88* ve *TRAF6* genlerinde gözlenen mRNA ekrespresyon değişimleri. Genlerin kantitasyonunda GAPDH mRNA ekrespresyon düzeyi esas alınarak normalizasyon sağlandı (*; p<0,05).

Kültür Çeşidi	BCL2	BCLXL	CASP3	IRAK4	MCL1	MYD88	TRAF6
Pam ₃ CSK ₄	2,1*	-0,3	1,5*	1,5*	3,6*	-1,1*	2,5*
IXS	-4,9*	-2,5*	2,3*	2,0	3,3*	2,5	3,4*
IXS – Pam ₃ CSK ₄	-2,1*	-1,5	3,2*	1,7*	4,3*	1,1	2,5*
IXS – VNT	0,4	-3,8	1,7*	1,3*	2,0*	0,5	2,3*
IXS – VNT – Pam ₃ CSK ₄	0,9*	-3,4*	0,7	-0,9*	0,6	-0,1	-0,7*

4.3. Protein Ekspresyon Sonuçları

U266, RPMI 8226 ve NCI H929 hücre hatlarında farklı kültür koşullarında protein ekspresyonlarının değerlendirilmesi için western blot analizi yapıldı. Uygulama hücrelerde apoptoz ilişkili Kaspaz 3 ve Bid proteinlerine özgün primerlerle gerçekleştirildi. Protein kontrolü olarak hücre iskeleti ana bileşeni β -aktin kullanıldı.

Protein analiz uygulamalarında CFZ inhibitörü 50nM, IXS inhibitörü 50nM ve VNT inhibitörü 90nM konsantrasyonlarında tekil ve kombine olarak, normal ve Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında 24 saatlik inkübasyonla uygulandı. U266, RPMI 8226 ve NCI H929 hücre hatlarındaki western blot ve rölatif kantitasyon sonuçları sırasıyla Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3'te verildi.

4.3.1. Kaspaz 3 Protein Ekspresyon Sonuçları

U266 hücre hattının normal kültür koşullarında, inaktif kaspaz 3 ekspresyonunun uygulamalar arasında değişkenlik gösterdiği bulundu. Buna göre inaktif kaspaz 3 ekspresyonu inhibitörsüz kontrol uygulamasında ve CFZ/VNT kombinasyonunda düşük dereceli, CFZ ve IXS tekil uygulamalarında orta dereceli, IXS/VNT kombinasyonunda belirgin olduğu gözlemlendi. Kaspaz 3'ün aktifleşmesi CFZ'nin tekil uygulamasında, IXS'in hem tekil hem de VNT ile kombinasyonunda saptandı. İnhibitörsüz kontrol uygulamasında benzer bir dönüşüm bulunmadı. Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarındaki inaktif kaspaz 3 ekspresyonu normal koşullardaki eşleniklerine benzer bir profil oluşturmakla birlikte daha düşük olduğu gözlemlendi.

RPMI 8226 hücre hattının normal kültür koşullarında, kontrol hücreleri, inhibitörlerin tekil ve kombinasyonlu uygulamalarında benzer derecelerde inaktif kaspaz 3 ekspresyonu gözlemlendi. Aktif kaspaz 3'e dönüşümde inhibitörsüz kontrol uygulamasında diğerlerine göre belirgin bir artış saptandığı halde CFZ ve IXS'in tekil uygulamalarında ekspresyon gözlenmedi. Ancak CFZ ve IXS'in VNT kombinasyonlarında belirli oranda aktif kaspaz 3 ekspresyonu saptandı. Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında ise inaktif kaspaz 3 ekspresyonu inhibitörsüz kontrol uygulamasında belirgin, ilaç uygulamalarında düşük dereceli olarak bulundu. Aktif kaspaz 3'e dönüşüm inhibitörsüz kontrol uygulamasında

düşük dereceli, inhibitör uygulamalarında belirgin ve artan ekspresyonlarda bulundu. Normal ve Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşulları karşılaştırıldığında, inaktif kaspaz 3'ün aktif forma dönüşümünün daha fazla olduğu gözlemlendi.

NCI H929 hücre hattının normal kültür koşullarında, inaktif kaspaz 3 ekspresyonunun inhibitörsüz kontrol uygulamasında ve ilaç uygulamalarında benzerlik gösterdi. Aktif kaspaz 3'e dönüşüm inhibitörsüz kontrol uygulamasında, CFZ ve IXS'in tekil uygulamalarında belirgin bir artış olarak gözlemlendi. Ancak VNT kombinasyonlarında daha düşük derecede gerçekleşti. Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında inaktif kaspaz 3 ekspresyonu inhibitörsüz kontrol uygulamasında, IXS'in tekil ve VNT kombinasyonlarında saptandı. Benzer bir profil inaktif kaspaz 3'ün aktif forma dönüşümünde de belirlendi. Söz konusu değişim inhibitörsüz kontrol uygulamasında belirgin, IXS'in tekil ve kombinasyonlarında düşük dereceli inaktif kaspaz 3 ekspresyonu ile gözlemlendi. Diğer taraftan, CFZ uygulamalarında benzer bir profil tespit edilemedi.

4.3.2. Bid Protein Ekspresyon Sonuçları

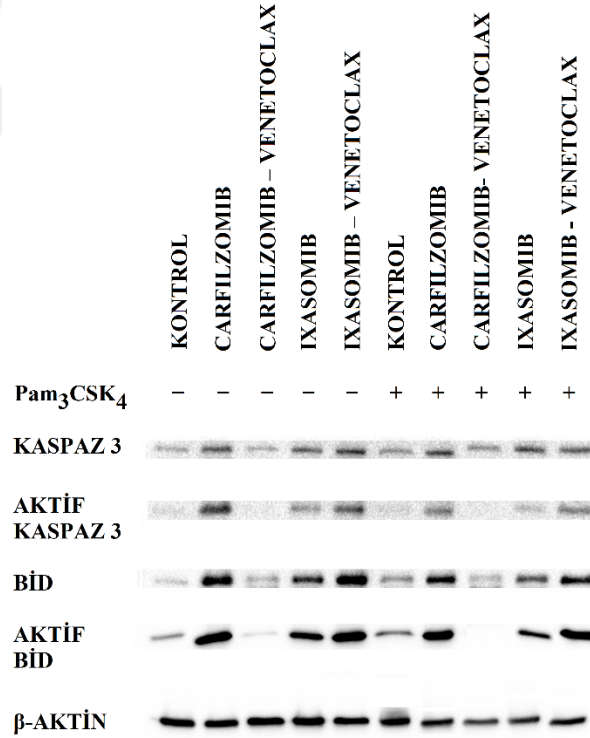
U266 hücre hattının normal kültür koşullarında, Bid'in inaktif formunun ekspresyonu uygulamalarda farklı derecelerde saptandı. Buna göre inhibitörsüz kontrol uygulamasının, CFZ ve IXS'in tekil uygulamalarının ekspresyonu VNT kombinasyonlarına göre daha belirgin gözlemlendi. Aktif Bid formunun ekspresyonu inaktife benzer bir profile ancak eşleniklerine göre daha güçlü gözlemlendi. CFZ/VNT kombinasyonunda aktif Bid formunun ekspresyonu tespit edilemedi. Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında inaktif Bid'in aktif formuna dönüşümünde benzer bir profil oluşturmakla birlikte ekspresyonun normal kültür koşullarına göre daha yüksek olduğu gözlemlendi.

RPMI 8226 hücre hattının normal kültür koşullarında, inaktif Bid formunun ekspresyonu iki bantlı olarak farklı derecelerde gözlemlendi. Aktif Bid formunun ekspresyonu inhibitörsüz kontrol uygulamasında belirgin şekilde, inhibitör uygulamalarında zayıf olarak tek bantlı olarak saptandı. Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında inaktif Bid formunun ekspresyonu benzer şekilde iki bantlı olarak değişen derecelerde gözlemlendi.

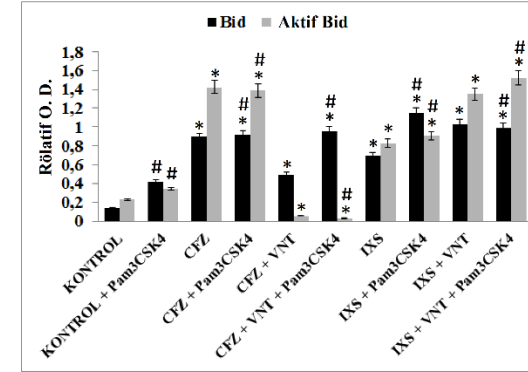
Aktif Bid ekspresyonunda ilginç şekilde, normal kültür koşullarındaki eşleniklerine göre inhibitörsüz kontrol uygulamasında azalma, CFZ/VNT kombiasyon uygulamasında ekspresyonda artış olarak gözlemlendi.

NCI H929 hücre hattının normal kültür koşullarında, inaktif Bid ekspresyonunun inhibitörsüz kontrol ve ilaç uygulamalarında benzerlik gösterdiği saptandı. Aktif Bid'e dönüşümde inhibitörsüz kontrol uygulaması ve IXS'in tekil uygulamalarında belirgin bir artış gözlemlendi. Normal kültür koşullarında inaktif Bid'ten aktif forma dönüşüm VNT kombinasyonlarında daha düşük derecede gerçekleşti. Pam₃CSK₄ stimülayonlu kültür koşullarında uygulamalarda inaktif Bid'in ekspresyonu değişen derecelerde gözlemlendi. Uygulamalarda inaktif Bid ekspresyonunun inhibitörsüz kontrol uygulamasında belirgin, CFZ'nin uygulamalarında IXS'e göre daha düşük olduğu gözlemlendi. Aktif Bid'e dönüşümde ise benzer bir profilde inhibitörsüz kontrol uygulamasında belirgin, IXS tekil ve kombinasyonlarında daha yüksek olarak gözlemlendi. Ancak CFZ'nin tekil uygulamasında oldukça düşük gözlemlendi ve VNT kombinasyonunda tespit edilemedi.

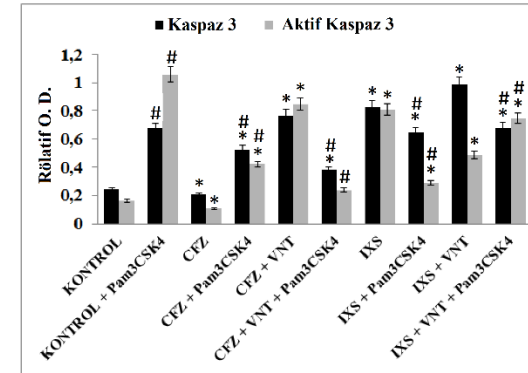
A)



B)

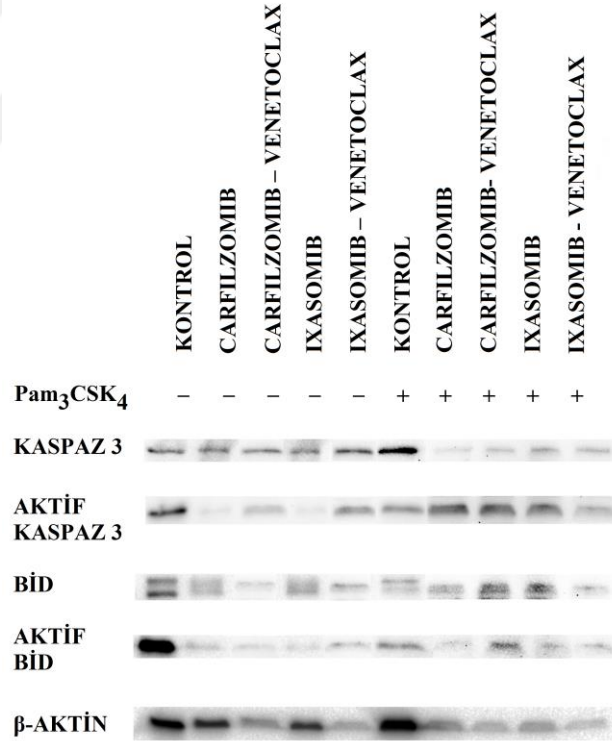


C)

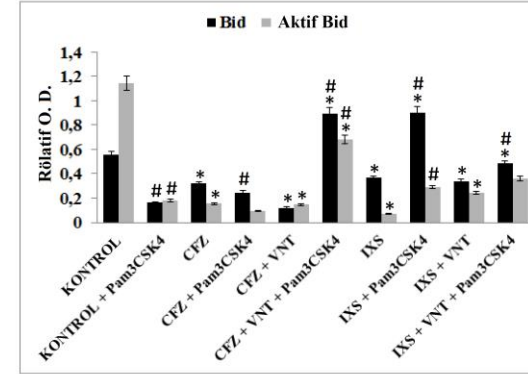


Şekil 4.6: U266 hücrelerinde normal ve Pam₃CSK₄ stimüasyonlu kültür koşullarında Karfilzomib, İksazomib ve Venetoklaks inhibitörlerinin tekil ve kombine uygulamalarının apoptoz ile ilişkili biyokimyasal belirteçler üzerindeki etkisi. Hücrelerde 24 saatlik kültürden hazırlanan toplam hücre lizatlarında Kaspaz 3, Aktif Kaspaz 3, Bid ve Aktif Bid proteinlerinin western blot ve rölatif değerleri ölçüldü. Yükleme kontrolü olarak β-aktin kullanıldı. A) Hücrelerin western blot analizinde elde edilen protein ekspresyon görüntüleri. B) Bid ve Aktif Bid proteinlerinin Image J analizinde elde edilen rölatif değerleri. C) Kaspaz 3, Aktif Kaspaz 3 proteinlerinin Image J analizinde elde edilen rölatif değerleri. Veriler, üç gözlemin ortalamasını temsil etmektedir. '*' Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı; '#', Gruplar arası eşlenikleri ile karşılaştırıldığında anlamlı (Kruskal Wallis Testi, p<0.05).

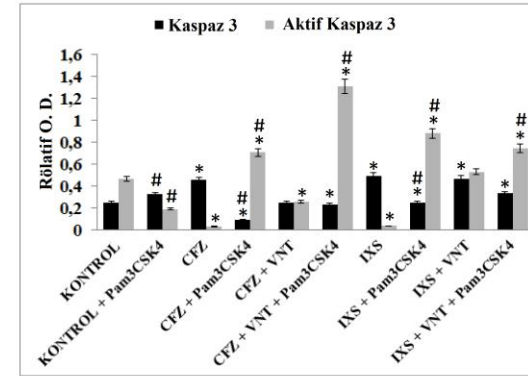
A)



B)

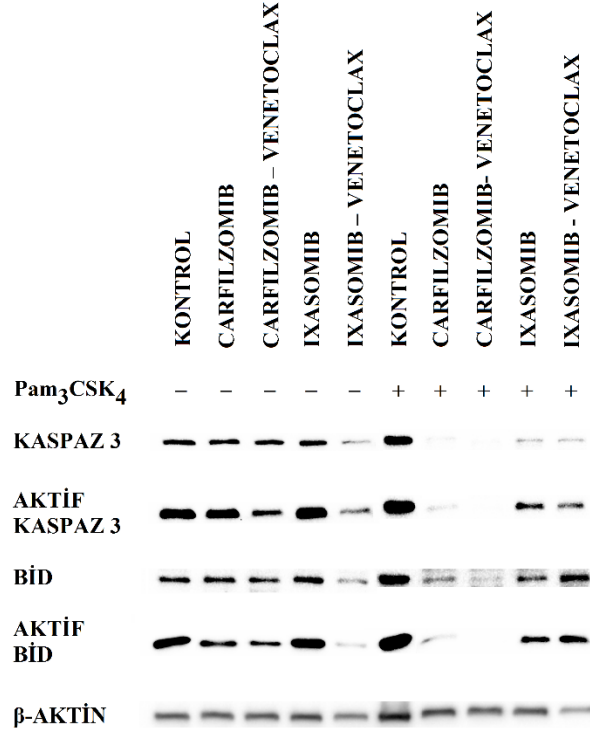


C)

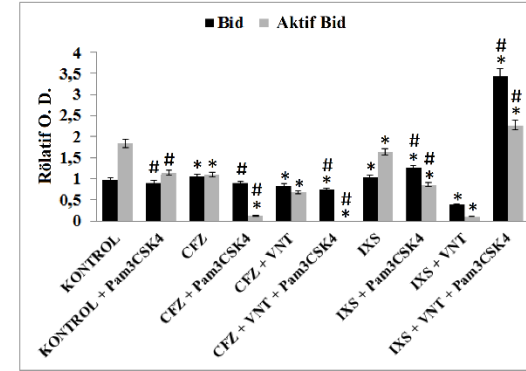


Şekil 4.7: RPMI 8226 hücrelerinde normal ve Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında Karfilzomib, İksazomib ve Venetoklaks inhibitörlerinin tekil ve kombine uygulamalarının apoptoz ile ilişkili biyokimyasal belirteçler üzerindeki etkisi. Hücrelerde 24 saatlik kültürden hazırlanan toplam hücre lizatlarında Kaspaz 3, Aktif Kaspaz 3, Bid ve Aktif Bid proteinlerinin western blot ve rölatif değerleri ölçüldü. Yükleme kontrolü olarak β-aktin kullanıldı. A) Hücrelerin western blot analizinde elde edilen protein ekspresyon görüntüleri. B) Bid ve Aktif Bid proteinlerinin Image J analizinde elde edilen rölatif değerleri. C) Kaspaz 3, Aktif Kaspaz 3 proteinlerinin Image J analizinde elde edilen rölatif değerleri. Veriler, üç gözlemin ortalamasını temsil etmektedir. '*' Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı; '#', Gruplar arası eşlenikleri ile karşılaştırıldığında anlamlı (Kruskal Wallis Testi, p<0.05).

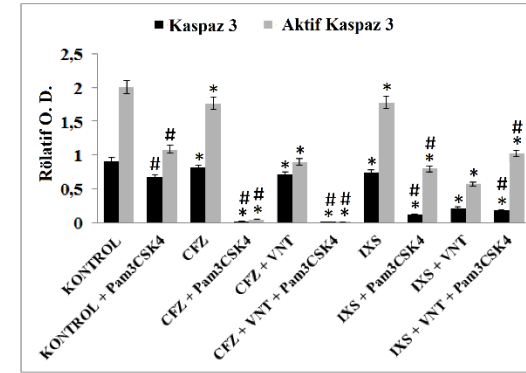
A)



B)



C)



Şekil 4.8: NCI H929 hücrelerinde normal ve Pam₃CSK₄ stimülayonlu kültür koşullarında Karfilzomib, İksazomib ve Venetoklaks inhibitörlerinin tekil ve kombine uygulamalarının apoptoz ile ilişkili biyokimyasal belirteçler üzerindeki etkisi. Hücrelerde 24 saatlik kültürden hazırlanan toplam hücre lizatlarında Kaspaz 3, Aktif Kaspaz 3, Bid ve Aktif Bid proteinlerinin western blot ve rölatif değerleri ölçüldü. Yükleme kontrolü olarak β-aktin kullanıldı. A) Hücrelerin western blot analizinde elde edilen protein ekspresyon görüntüleri. B) Bid ve Aktif Bid proteinlerinin Image J analizinde elde edilen rölatif değerleri. C) Kaspaz 3, Aktif Kaspaz 3 proteinlerinin Image J analizinde elde edilen rölatif değerleri. Veriler, üç gözlemin ortalamasını temsil etmektedir. '*' Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı; '#', Gruplar arası eşlenikleri ile karşılaştırıldığında anlamlı (Kruskal Wallis Testi, p<0.05).

5. TARTIŞMA

Toll Like reseptörleri, organizmanın doğal ve kazanılmış bağışıklık yanıtında önemli bir bağlantıyı temsil etmektedir. Çeşitli kanser hücre tiplerinde ekspresyonları raporlanmış olup, kanser hücreleri üzerindeki olumlu/olumsuz etkileri mevcuttur (Nomi ve ark., 2010). Araştırmalar, TLR'lerin kanser patogenezinde ve neoplastik sürecin ilerlemesinde TLR sinyal yollarının etkin rol aldığını göstermektedir. Bu noktadan hareketle TLR sisteminin neoplastik süreçteki rolü incelenmektedir. Elde edilen klinik ve deneysel veriler TLR'lerin kanser sürecine katkısının yanısıra tedavide de kullanılabileceğini göstermektedir. Böylelikle kanser patogenezinde iki ucu keskin bir kılıç olarak tanımlanmaktadır (Killeen ve ark., 2006).

Çalışmamızda multiple myelom hastalık modeli olarak 3 hücre hattında yeni nesil kemoterapik ajanların etkinliğini farklı kombinasyon modellerinde inceledik. Araştırmamızdaki kombinasyon bileşenleri proteozom inhibitörleri CFZ ve IXS, TLR1/2 sinyal yolu uyarıcı ligand Pam₃CSK₄ ve anti-apoptotik protein inhibitörü VNT'dir.

Proteozom inhibitörleri CFZ ve IXS ikinci jenerasyon BTZ türevleridir (Azab ve ark., 2016; Besse ve ark., 2019; Kuhn ve ark., 2007). Yeni proteozom inhibitörlerinin farmakolojik özelliklerini ve klinik sonuçlarını ve MM tedavisindeki potansiyellerini değerlendiren Hungria ve ark. (2018) CFZ ve IXS'in üstün özelliklerine dikkat çekmiştir. Buna göre CFZ, BTZ'den farklı olarak geri dönüşümsüz ve daha yüksek afinite proteozoma bağlanmaktadır. Peptid içerikli yapısı nedeniyle endojen proteazlar ve plazma peptazları tarafından kolayca parçalanabilir olup yarı ömrü oldukça kısadır. Buna rağmen uygulamasını takiben proteozom aktivitesi %20'ye yakın oranda düşer ve inhibitif etkinin giderilmesi yeni altbirimlerin sentezini ve proteazomların oluşturulmasını gerektirir. Böylelikle proteozom inhibisyonu daha hedefe yönelik ve sağlıklı hücrelere toksisite oluşturmeyen formda sunulur. IXS ise, kimyasal formülü ve proteozoma geridönüşümlü bağlanması yönleriyle BTZ ile büyük oranda benzerlik göstermektedir. Ancak diğer jenerasyon ajanlarla kıyaslandığında en yüksek afinite değerine sahip olması, aktif ilaç formunun hidroliz gerektirmesi ve BTZ'ye göre çok daha

hızlı yarı ömrü ile üstün farmakokinetik ve farmakodinamik profile sahip olmaktadır (Hungria ve ark., 2019).

5.1. Hücre Canlılığı Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Deneylerimizde CFZ ve IXS için elde ettiğimiz IC_{50} değerlerini literatürdeki BTZ verileriyle karşılaştırdığımızda söz konusu avantajlarını gözlemledik. Buna göre BTZ'nin primer MM hücreleri üzerindeki anti-tümör etkisini değerlendiren Erçetin ve ark. (2016), 24 saatlik uygulamada IC_{50} değerlerini 10-100000 nM aralığında bulmuştur. Deneylerimizde hem CFZ hem de IXS için çok daha düşük ve küçük bir aralıkta IC_{50} değerlerini elde ettik (90,1-793,8 nM). MM hücrelerinde tedavi etkinliğini arttırmayı hedefleyen Abdi ve ark. (2013) 3 farklı hücre hattında BTZ'nin duyarlılığını değerlendirmiştir. Araştırmada IC_{50} değerlerini 2350 – 13300 nM aralığında raporlamıştır. Aynı araştırma ekibinin 2014 yılında diğer bir raporunda söz konusu aralık 11200 – 41100 nM olarak verilmiştir. Bu değerler bizim değerlerimizle kıyaslandığında oldukça yüksek olup CFZ ve IXS'in yüksek etkinliğini göstermektedir.

TLR sinyal yolu uyarıcı ligandımız Pam₃CSK₄ olup TLR1/2 sinyal yolu üzerinden hücreyi stimüle etmektedir. Literatürde lenfositik hücreler üzerindeki uyarıcı etkisine yönelik farklı yanıtlar tanımlanmıştır. Buna göre TLR agonistleri ve anti-kanser kemoterapotiklerinin sinerjik kullanımını inceleyen Lee ve ark. (2014), TLR uyarımının B hücreli lenfomada hücre immünojenitesini değiştirerek konvansiyonel terapi etkinliğini arttırılabileceğini göstermiştir. Buna göre araştırmacılar Pam₃CSK₄ situmulasyonunun tümör hücre apoptozunda veya proliferasyonunda etki göstermediği, ancak immünomodülatör moleküllerin tümör hücre yükünü azalttığını ifade etmiştir. Deneylerimizde bu verilere zıt biçimde Pam₃CSK₄ stimülasyonu hücre canlılığında ve proliferasyonunda belirgin bir artış gözlemledik. Söz konusu değişim ligand varlığında daha yüksek IC_{50} değerlerinin elde edilmesiyle gösterildi.

TLR'lerin B hücre aktivasyonu ve farklılaşmasındaki rolünü inceleyen Lee ve ark. (2018), Pam₃CSK₄'ün hücre canlılığına, proliferasyonuna ve antikor üretimine etkisini incelemiştir. Çalışmalarında, Pam₃CSK₄'ün potansiyel bir mitojen olarak işlev gördüğü ifade edilmiştir. Ligand dozununun arttırılması, antikor üretimine etkisi sınırlı olmakla

birlikte hücre canlılığında ve proliferasyonunda belirgin bir artışa neden olmuştur. Ancak söz konusu artış hücre farklılaşması üzerinde etki göstermemiştir. Bizim çalışmamızda da benzer biçimde Pam₃CSK₄ stimülasyonu ile hücre canlılığında ve proliferasyonunda belirgin bir artış gözlemledik. Bu durum ligand kullanılan ve kullanılmayan kültürlerde elde edilen IC₅₀ değerlerindeki farklılıkla belirgin şekilde gözlemlendi. Ligand varlığında hücrelerde daha yüksek IC₅₀ değerleri saptandı.

Anti-apoptotik protein inhibitörü VNT hücrede BCL2'yi selektif olarak hedef almaktadır ve tekil kullanımı hücre ölümünü tetiklemede yeterlidir (Punnoose ve ark., 2016). Bu doğrultuda inceleme yapan Touzeau ve ark. (2014) özellikle t(11;14) translokasyonlu relapslı MM hastalarında VNT ile etkili sonuçlar elde etmiştir. Böylelikle VNT'nin MM'de spesifik bir sitogenetik alt grup için tekil ajan olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Ayrıca çalışmada dirençlilik gelişmiş hastalarda VNT kullanımı değerlendirilmiş ve kemoterapik ajanın MM hücrelerinin BCL2'ye bağımlılığını artırıcı etkisinin kombine tedavide kullanıma potansiyeline işaret edilmiştir. Bu doğrultuda deneylerimize ilave ettiğimiz VNT inhibitörünün sinerjik etkisini gözlemledik. Gerek proteozom inhibitörlü gerekse Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında VNT kombinasyonlarıyla IC₅₀ değerlerinde belirgin bir azalma belirledik.

VNT'nin kombine tedavide kullanımına uygunluğunu hücre hatlarında ve primer hasta örneklerinde inceleyen Matulis ve ark. (2016) farklı ajanlar arasında en olumlu sonuçların geleneksel terapi ajanı Dexamethasone (DEX) ile elde edildiğini raporlamıştır. Ayrıca çalışmadaki diğer ajanlardan melphalan veya CFZ ile hücre ölümünün arttığı ifade edilmiştir. VNT/DEX kombinasyonunda elde edilen etkinliğin hücrede tedavi sürecinde gelişen BCL2 bağımlılığı ile açıklanmıştır. Bu durum terapi ajanına bağlı gelişen hücre içi dengenin VNT aracılığıyla daha etkili tedavi kombinasyonlarına imkan vermesi olarak yorumlanmıştır. Çalışmamızda bu verileri dikkate alarak BTZ türevi CFZ ve IXS'i VNT kombinasyonlarıyla inceledik. Bunlara ek olarak hücre içindeki apoptoz dengesinin değişiminde TLR1/2 ligandı Pam₃CSK₄ stimülasyon etkisini kombinasyona dahil ettik. Çünkü TLR1/2 reseptörünün hücre apoptozunda rol aldığı tanımlanmış ve NFκB inhibitörü kullanımının hücre içindeki dengenin apoptoza yönelimini arttırdığı gösterilmiştir (Aliprantis ve ark., 2000). Nitekim Pam₃CSK₄ uyarımı hücrede NFκB

aktivasyonunu sağlamaktadır. Aynı koşullarda CFZ ve IXS varlığı NFκB aktivasyonunda inhibisyonu yol açmaktadır (Demchenko ve Kuehl, 2010). Bu durumda Pam₃CSK₄ uyarımı hücre içinde alternatif yolağa yönelmekte ve hücreyi apoptoza götüren FAS ilişkili ölüm domainli sinyal yolu çalışmaktadır (Salaun ve ark., 2006). Söz konusu etkileri bulgularımızda değişen IC₅₀ değerleriyle gözlemledik. Buna göre CFZ ve IXS için Pam₃CSK₄ sitümüstasyonlu koşullarında normal kültür koşullarına göre daha yüksek IC₅₀ değerleri elde ettik. Ayrıca proteozom inhibitörlü ve Pam₃CSK₄ sitümüstasyonlu koşullara VNT'yi dahil ettiğimizde IC₅₀ değerlerinde belirgin bir azalma belirledik. Böylelikle Pam₃CSK₄ sitümüstasyonlu koşullarına proteozom inhibitörlerinin yanısıra anti-apoptotik protein inhibitörü VNT'nin ilavesinin sinerjik etkisini ortaya koyduk.

5.1.1. Normal Kültür Koşullarında Tek İnhibitörlü IC₅₀ Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Mitra ve ark. (2016), MM'da gözlenen tümör progresyon heterojenliğinin, klinik agresifliğin ve değişken ilaca duyarlılığının alt klonlardaki genetik çeşitlilik ile karakterizasyonunu göstermiştir. Bu amaçla, proteozom inhibitörleri ile 11 MM hücre hattında biyoinformatik analiz gerçekleştirmiştir ve IC₅₀ değerlerinin ortalamasının CFZ'de 18,96 nM olarak raporlamıştır. Söz konusu aralık deneylerimizde elde edilen 57,5 - 835,4 nM aralığına göre oldukça düşüktür. IXS için IC₅₀ değerlerinin ortalaması 592,5 nM olarak raporlamıştır ve bu aralık deneylerimizdeki 54,4-732,6 nM aralığını kapsamaktadır. Diğer taraftan, aynı araştırmacı grubu 2020 yılında ilave bulgularla yeni bir rapor yayınlamıştır. Araştırmada 12 miyelom hücre hattında IXS için IC₅₀ değerlerinin aralığı 15-220 nM olarak saptanmış olup bu aralık deneylerimizde elde ettiğimiz 54,4-732,6 nM aralığına göre düşüktür (Mitra ve ark., 2020).

MM tedavisinde alternatif stratejilere yönelik araştırma yapan Touzeau ve ark. (2014), anti-apoptotik proteinleri hedefleyen ABT-737 ve VNT inhibitörlerini 25 hücre hattında değerlendirmiştir. VNT'nin sağlıklı hücreleri hedef almadığı sağlıklı donörlerde daha yüksek çıkan IC₅₀ değeriyle gösterilmiştir. Çalışmada MM hücrelerindeki IC₅₀ değerlerinin VNT'de diğer inhibitöre göre daha düşük çıktığı ve 8-10000 nM aralığında

olduğu saptanmıştır. Deneylerimizde de benzer biçimde 3 hücre hattında 94,7-1396,6 nM aralığında ancak daha küçük bir spektrumda heterojen IC₅₀ değer dağılımı gözlemlendi.

Deneylerimizde CFZ inhibitörüyle U266 hücre hattında elde ettiğimiz 90,1 nM ve üzerindeki IC₅₀ değerleri literatürde raporlanan eşleniklerinden yüksek bulundu. Buna göre; MM hastalarında gelişen proteozom inhibitör dirençlilik mekanizmalarını inceleyen Tomlin ve ark. (2017), U266 hücre hattında CFZ'ye yönelik IC₅₀ değerini 24 saatlik uygulamada yaklaşık 18 nM olarak belirlemiştir. CFZ'in hücre içi birikimini, hedef proteozoma bağlamasını ve bu süreçlerin hücre canlılığı ile ilişkisini karakterize etmeyi hedefleyen Schäfer ve ark. (2017), CFZ inhibitörünün kültür koşullarında sürekli ve kısa süreli bulunduğu IC₅₀ değerini 24 saatlik uygulamada sırasıyla 18.6 nM ve 59.2 nM olarak belirlemiştir. Kanser hücreleri için daha yüksek *in vitro* potansiyele ve seçici sitotoksositeye sahip yeni peptidomimetik inhibitörleri BTZ ve CFZ ile inceleyen Zhang ve ark. (2016), IC₅₀ değerini CFZ inhibitörü için 48 saatlik uygulamada 60 nM olarak raporlamıştır. CFZ'in terapötik etkinliğini, BTZ ile karşılaştırmalı değerlendiren ve tedaviye dirençli hücrelerde doza ve zamana bağlı inhibisyonunu araştıran Kuhn ve ark. (2007), IC₅₀ değerini CFZ inhibitörü için 24 saatlik uygulamada 5 nM'dan az olarak saptamıştır. İbrutinib'in, proteozom inhibitörü CFZ ve immünomodülatör ajan LLD ile kombinasyonlarını BTZ 'ye dirençli hücre hattındaki sitotoksik etkisini belirlemeyi amaçlayan Terzi ve ark. (2019), IC₅₀ değerini CFZ inhibitörü için 24 saatlik uygulamada 81 µM olarak saptamıştır. Söz konusu sonuç literatür eşlenikleri arasında elde ettiğimiz 90,1 nM'dan yüksek olan değerdir.

Literatürde RPMI 8226 hücre hattı için verilen CFZ'ye yönelik IC₅₀ değeri çalışmamızdaki 462 nM ve üzerindeki değerlerden oldukça düşük bulunmuştur. Buna göre: CFZ'in hücre içi birikimini, hedef proteozoma bağlamasını ve bu süreçlerin hücre canlılığı ile ilişkisini karakterize etmeyi hedefleyen Schäfer ve ark. (2017), 24 saatlik uygulamada inhibitörün kültür koşullarında sürekli ve kısa süreli bulunduğu deneylerde IC₅₀ değerini sırasıyla 4.10 nM, 37.1 nM olarak belirlemiştir. CFZ'in terapötik etkinliğini, BTZ ile değerlendiren ve tedaviye dirençli hücrelerde doza ve zamana bağlı inhibisyonunu araştıran Kuhn ve ark. (2007), IC₅₀ değerini CFZ inhibitörü için 24 saatlik uygulamada 5 nM'dan az olarak raporlamıştır.

Deneylelerimizde NCI H929 hücre hattı için gözlemlediğimiz 793,8 nM ve üzerindeki IC₅₀ değerleri literatüre göre oldukça yüksek bulundu. Buna göre MM hastalarında gelişen proteozom inhibitör dirençlilik mekanizmalarını inceleyen Tomlin ve ark. (2017), NCI H929 hücre hattında CFZ'ye yönelik IC₅₀ değerini yaklaşık 24 saatlik uygulamada 5 nM olarak belirlemiştir.

Literatürde VNT uygulamalarında U266 hücre hattı için verilen IC₅₀ değerleri çalışmamızda belirlenen 203,5 nM ve üzerindeki değerlere göre daha yüksek bulunmuştur. Buna göre; Seiller ve ark. (2020), antiapoptotik proteinlerin inhibisyonunu hem 25 hücre hattında hem de primer örneklerde değerlendirmiş ve VNT dirençliliğinin giderilmesi için kombinasyonun kullanışlı olabileceğini ifade etmiştir. Araştırmada U266 hücre hattında 24 saatlik uygulama için IC₅₀ değerini 8000 nM olarak raporlanmıştır. Gomez-Bougie ve ark. (2018), MM'da daha etkili tedavi açısından BH3-mimetiklerini 33 hücre hattında inceledikleri çalışmalarında VNT'nin etkinliğine dikkat çekmiştir. Çalışmada 24 saatlik uygulama için IC₅₀ değeri 8000 nM olarak belirlemiştir. Gong ve ark. (2016), MM hastalarında daha etkili tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi için anti-apoptotik proteinleri hedef alan metodları 25 hücre hatlık geniş bir panelde incelemiştir. Araştırmada farmakolojik inhibitörleri, gen düzenleme araçlarını ve peptit bazlı yaklaşımları tek başına veya kombinasyon halinde kullanmıştır. VNT için IC₅₀ değerini 48 saatlik uygulamada 5000 nM'dan yüksek olarak belirlemiştir.

RPMI 8226 hücre hattında VNT inhibitör uygulamalarında elde ettiğimiz 135,6 nM ve üzerindeki IC₅₀ değerleri literatürdeki eşleniklerine göre oldukça düşüktü. Buna göre; VNT'nin etkili olduğu MM hasta grubunu belirlemek amacıyla araştırma yapan Matulis ve ark. (2016), 5 hücre hattında 24 saatlik uygulamada apoptoz indüksiyonunu incelemiştir. Çalışmada, literatürle uyumlu olarak sadece RPMI8226 yeterli doz yanıtı göstermiş ve 2200 nM'lık IC₅₀ değeri belirlenmiştir. Bu değer deneylelerimizde elde ettiğimiz 111,6 - 251 nM aralığına göre oldukça yüksektir. Anti-apoptotik proteinleri hedefleyen ABT-737 ve VNT inhibitörlerinin MM tedavisinde kullanımını inceleyen Touzeau ve ark. (2014), 48 saatlik uygulamada 25 hücre hattında IC₅₀ değerlerini belirlemiştir. Araştırmada RPMI 8226 hücre hattı inhibitöre orta dereceli duyarlılık göstermiş ve IC₅₀ değeri 1000 nM olarak raporlanmıştır. BCL2 ailesi proteinlerini seçici

olarak hedefleyen antagonistleri değerlendiren Punnoose ve ark. (2016), hücre hatlarının VNT'ye duyarlılığında heterojen sonuçlar elde etmiştir. 72 saatlik uygulamada IC₅₀ değerini RPMI 8226 hücre hattında 3000 nM olarak belirlemiştir. MM hastalarında daha etkili tedavi seçenekleri için Gong ve ark. (2016), anti-apoptotik proteinleri hedef alan metodları incelemiştir. Çalışmalarında farmakolojik inhibitörleri, gen düzenleme araçlarını ve peptit bazlı yaklaşımları tek başına veya kombinasyon halinde kullanarak veri analizi gerçekleştirmiştir. RPMI 8226 hücre hattında IC₅₀ değeri VNT için 48 saatlik uygulamada 5000 nM'dan yüksek olarak belirlemiştir.

NCI H929 hücre hattı için VNT uygulamalarında elde ettiğimiz 919,8 nM ve üzerindeki IC₅₀ değerleri literatürdeki verilerine göre düşük bulunmuştur. Buna göre; Gomez-Bougie ve ark. (2018), MM hastalarında tanı ve relaps sürecindeki pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki dengeyi incelemiştir. VNT'nin tekli ve/veya diğer BH3-mimetikleriyle kombine kullanılabileceğini ifade etmiştir. 3 farklı BH3-mimetikini 33 hücre hattında inceledikleri araştırmada VNT'nin IC₅₀ değerini 24 saatlik uygulama için 5000 nM olarak belirlemiştir. Punnoose ve ark. (2016) BCL2 ailesi proteinlerini seçici olarak hedefleyen VNT'nin tekil ve BTZ ile kombine kullanımı 21 hücre hattı ile inceledikleri araştırmalarında, inhibitör duyarlılığında heterojen sonuçlar raporlamıştır. Çalışmada 72 saatlik IC₅₀ değerini NCI H929 hücre hattında 3000 nM olarak belirlemiştir. Gong ve ark. (2016), MM hastalarında daha etkili tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi için 25 hücre hattında anti-apoptotik proteinleri hedef alan metodları incelemiştir. NCI H929 hücre hattında IC₅₀ değeri VNT için 48 saatlik uygulamada 5000 nM'dan yüksek olarak belirlemiştir.

Deneylerimizde IXS uygulamalarında U266, RPMI 8226 ve NCI H929 hücre hatları için belirlediğimiz IC₅₀ değerleri sırasıyla 136,1 nM, 373 nM ve 383,2 nM'dı. Literatürde sadece RPMI 8226 ve NCI H929 hücre hatlarında eşlenik değerler mevcuttu ve bizim değerlerimize göre oldukça küçüktü. Buna göre IXS'in MM'deki etkinliğini *in vitro* ve *in vivo* modellerde değerlendiren Chauhan ve ark. (2011) antitümör aktivitesini incelemek için 7 MM hücre hattı kullanılmıştır. Araştırma sonucunda inhibitör için 48 saatlik uygulamada IC₅₀ değerlerini RPMI 8226 hücre hattı için 6 nM, NCI H929 hücre hattı için 15 nM olarak belirlenmiştir.

5.1.2. Toll Like Reseptörleri Stimülasyonlu Kültür Koşullarında IC₅₀ Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Deneylerimizde literatür verileriyle uyumlu olarak U266, RPMI 8226 ve NCI H929 hücre hatlarında Pam₃CSK₄ ligandı ile TLR1/2'nin stimülatif etkisini gözlemledik. Pam₃CSK₄ stimülasyonu hücre canlılığında ve proliferasyonunda artış ortaya çıktı. Normal kültür koşullarında Pam₃CSK₄ stimülasyonlu koşullara göre daha düşük IC₅₀ değerleri elde ettik. Ancak CFZ ve IXS'in VNT ile kombinasyonu IC₅₀ değerlerinde değişime sebep oldu. Böylelikle tek inhibitörlü ve ligand uyarımlı kültür koşulları arasında en düşük IC₅₀ değerlerini 3 kombinasyonlu kültürlerde gözlemledik. Bu durum Pam₃CSK₄ stimülasyonunun hücreler üzerindeki proliferatif etkisinin VNT'nin kombinasyona dahil edilmesiyle yönlendirilmesi olarak değerlendirilebilir.

MM hücreleri özgün TLR ligandların etkisiyle belirgin yanıtlar oluşturabilmektedir (Bagratuni ve ark., 2019). Literatürde farklı TLR stimülasyonlarının hücre proliferasyonuna ve canlılığına olumlu/olumsuz katkıları bildirilmektedir. Buna göre Cho ve ark. (2014), MM hastalarında sitotoksik terapilerin başarısızlık nedenlerini ve ilaca dirençlilik mekanizmalarını TLR5 ile araştırmıştır. Araştırmacılar TLR5 ligandlı stimülasyonun, NFκB aktivasyonu ve pro-inflamatör IL-6'nın yüksek dereceli ekspresyonu/sekresyonu aracılığıyla hücrelerde proliferasyonda artış sağladığı bildirmiştir. Çalışmada 3 farklı kemoterapi ajanıyla yapılan değerlendirmede ligand varlığında ilaçların sitotoksik etkileri önemli ölçüde giderilmiştir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde Pam₃CSK₄ ile TLR1/2 stimülasyonu tüm kemoterapik ajanlarda hücre canlılığının artmasına neden oldu ve daha yüksek IC₅₀ değerleri gözlemledik. TLR1/2 ile TLR5'in hücrelerde benzer stimülatif etki göstermesi hücre içinde ortak sinyal yolu kullanımlarıyla ilişkili olabilir. Nitekim, her iki reseptörün sinyal yolunda MyD88 ve TRAF6 adaptörleri etkileşim göstermektedir (So ve Ouchi, 2010).

Chiron ve ark. (2009), MM hücrelerinde TLR fonksiyonunu araştırdıkları çalışmalarında TLR3 bağımlı interferon β yanıtının proliferasyon ve hayatta kalma etkisini değerlendirmiştir. TLR3 ligandına özgü reseptöre sahip olan NCI-H929 ve RPMI 8226 hücrelerinde proliferasyonda azalma, reseptörü olmayan U266 hücrelerinde herhangi bir

değişim gözlenmemiştir. Bizim çalışmamızda hücrelerinin inhibitör uygulamalarındaki IC₅₀ değeri TLR1/2 ligandı Pam₃CSK₄ ile belirgin şekilde etkilendi. Buna göre 3 hücre hattında da Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında normal kültür koşullarına göre daha yüksek değerler bulundu. Bu durum TLR1/2 stimülasyonunun hücreler üzerinde proliferasyonu teşvik edici etkisi ve kemoterapik ajanların apoptotik gücünü zayıflatması olarak değerlendirilebilir. Aynı çalışmada Chiron ve ark. (2009) söz konusu TLR3 bağımlı proliferatif etkinin NFκB aktivasyonu ile gerçekleştiğini göstermiştir. Bu amaçla ligand stimülasyonlu kültür koşullarında NFκB inhibitörü kullanarak öncesinde proliferasyon artışı olan hücrelerde proliferasyon azalışını sağlamıştır. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde CFZ/VNT ve IXS/VNT kombinasyonlarında daha düşük IC₅₀ değerleri elde edildi. Böylelikle kombine tedavinin proliferasyon ve anti-apoptotik etkiyi değiştirebileceği belirlendi.

Bagratuni ve ark. (2019), MM hücre hatlarında ve primer hasta örneklerinde lipopolisakkarit aracılı TLR4 aktivasyonunun etkilerini incelemiştir. BTZ inhibitörüyle yapılan incelemelerde, TLR4 ekspresyonunu mRNA ve protein düzeyinde gösteren hücrelerde proliferasyonun belirgin ölçüde arttığı ve endoplazmik retikulum uyarımlı apoptozun azaldığı bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde, Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında normal kültür koşullarına göre daha yüksek IC₅₀ değerleri gözlemlendi. İnhibitörlere rağmen hücre canlılığında artış yaşanması U266, NCI-H929 ve RPMI 8226 hücre hatlarında TLR1/2 reseptörünün varlığını ve liganda yanıtla ilişkilendirilebilir. Nitekim literatürde yapılan taramada farklı araştırma gruplarında gerek mRNA gerekse protein düzeyinde veriler mevcuttur (Abdi ve ark., 2013; Abdi ve ark., 2014; Bohnhorst ve ark., 2006; Lee ve Park, 2018; Lee ve ark., 2014; Weir ve ark., 2017).

Bohnhorst ve ark. (2006), çeşitli TLR'lerin fonksiyonunu MM hücre hatlarında ve hasta primer örneklerinde incelemiştir. Belirli ligandların İL6'nın otokrin üretimini indükleyerek MM hücrelerinin hayatta kalması ve proliferasyonunu arttırdığı raporlamıştır. Çalışmada Pam₃CSK₄ türevi Pam₃CYS'nin primer hasta örneklerinde hücre canlılığını arttırdığı gözlemlenmiştir. Deneylerimizde benzer şekilde her 3 hücre hattında Pam₃CSK₄'ün hücre proliferasyonuna olumlu etkisini gözlemledik. CFZ, IXS ve

VNT inhibitörleri için Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarında normal költür koşullarına göre daha yüksek IC₅₀ değeri elde ettik.

Abdi ve ark. (2013), MM hücrelerinin endojen ligandlarla uyarılmasının hücre canlılığına ve ilaç dirençliliğine yönelik etkisini incelemiştir. Araştırmada U266 hücre hattında Pam₃CSK₄ ligandı ile TLR1/2 aktivasyonu sağlanmış ve proteozom inhibitörü BTZ'nin duyarlılığı değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ligandla hücre stimölasyonu inhibitör sitotoksitesini arttırmış ve IC₅₀ değeri Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarında (1450nM) normal költür koşullarına göre (2350 nM) daha düşük bulunmuştur. Aynı araştırma ekibi daha sonra hücre hattı sayısını arttırarak deneylerini tekrarlamıştır. Bu çalışmada Abdi ve ark. (2014), önceki bulgularıyla uyumlu olarak inhibitör sitotoksitesinin ligandla arttığını gözlemlemiştir. Buna göre IC₅₀ değeri Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarında (5600nM) normal költür koşullarına göre (11200 nM) daha düşük bulunmuştur. Deneylerimizde bu sonuçlardan farklı olarak hem CFZ hemde IXS'te Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarında daha düşük IC₅₀ değeri gözlemledik. CFZ ve IXS'in, BTZ'nin yeni nesil versiyonları olması ve daha güçlü sitotoksiste oluşturmaları deneylerimizde daha düşük IC₅₀ değeri çıkmasının olası nedenidir. Diğer taraftan, bulgularımızda Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşulları hücre canlılığını arttırıcı etki oluşturdu. Bu durum ligand uyarımının myeloma hücrelerinde proliferatif etki oluşturmaları olarak değerlendirilebilir ve üstte belirtilen sonuçlardan farklıdır. Ancak aynı ligand uyarımlı koşullarda CFZ ve IXS'in VNT ile kombinasyonu IC₅₀ değerini düşürdü. Her bir inhibitörde en düşük IC₅₀ değeri, VNT'nin dahil edildiği költür koşullarında saptandı. Böylelikle Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarına proteozom inhibitörünün yanısıra VNT'nin dahil edilmesi hücre sitotoksitesini arttırıcı etki gösterdi.

5.1.3. Toll Like Reseptörleri Stimölasyonlu Költür Koşullarında Kombine İnhibitörlü IC₅₀ Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Literatürde MM tedavisine yönelik farklı kombinasyon incelemeleri yoğun bir araştırma konusudur (Lee ve ark., 2010; Terzi ve ark., 2019; Kikuchi ve ark., 2018; Chen ve ark., 2017; Abdi ve ark., 2013; Abdi ve ark., 2014). Bu süreçte mevcut kemoterapiklerin yeni

kombinasyonlarının değerlendirilmesinin yanısıra, farklı kanser türlerindeki ilaçların veya tamamen yeni üretilmiş bileşenlerin incelemeleri yapılmaktadır. Örneğin; Norris ve ark. (2016), relaps gelişen MM hastalarında yeni bir tedavi rejiminin etkinliğini değerlendirmiştir. Bu amaçla yeni ajan Filanesib'in geleneksel tedavi ajanlarıyla kombinasyonlarını incelemiş ve korelatif tedavi rejiminin hastalarda olumlu sonuç verdiğini raporlamıştır. Bordini ve ark. (2020), hücrelerdeki demir miktarının etkisini BTZ etkinliğinin artırılması ve hücre proliferasyonunun bozulması yönünden MM hücre hatlarında araştırmıştır. Yüksek dozlu demir amonyum sitrat'ın BTZ ile kombinasyonunun hücrede lipid tabakalara zarar verdiği, poliubikütilenmiş protein akümüleyonunu arttırdığı ve hücre ölümünü daha verimli sağladığı gözlenmiştir. Astakhova ve ark. (2018), BTZ'nin yan etkilerini hafifletmek ve daha düşük dozlarda etkin tedavi yapabilmek için menadion sodyum bisülfid ile kombinasyonunu incelemiştir. Bileşenin BTZ ile sinerjik etkinliği MM hücrelerindeki anti-tümör gücü ve IC₅₀ değerleri BTZ'nin tekil kullanımına göre büyük oranda düşürmesiyle gösterilmiştir. Kombinasyon sayesinde MM hücrelerinde oksidasyonun teşvik edildiği, süperoksit radikalleri üretilmesinin sağlandığı ve proteozom disfonksiyonunun daha etkili gerçekleştiği ifade edilmiştir. Park ve ark. (2008), MM patogeneğinde kritik rol oynayan tümör ve kemik iliği stromal hücreleri arasındaki mikroçevreyi hedef alan terapi stratejisine odaklanmıştır. Çalışmada doğrudan MM-stroma hücre mikroçevresini etkileyen curcumin aktif bileşeninin BTZ ile kombinasyonu olumlu sonuçlar vermiştir. Walsby ve ark. (2010), MM hücre hatları ve primer hasta örneklerinde yeni bir NFκB inhibitörünün incelemesi geleneksel kemoterapik ajanlarla kombine ederek incelemiştir. Bulgular yeni bileşenin yüksek sinerji gösterdiğini ve sitotoksik etkiyi arttırdığını ortaya koymuştur. Weir ve ark. (2008), B hücrelerinin aktivasyonu ve plazma hücrelerinin uyarılmasına yönelik TLR ligandlarında inceleme yapmıştır. Hücrelerin ligand varlığında yüzeylerinde özgün reseptör ekspresyonunun arttığı, sitokin salgısının başladığı ve proliferasyonun desteklendiği gözlenmiştir. Chen ve ark. (2021), farklı kanser tiplerinde kemoterapik ilaçların etkinliğini arttıran Dokosaheksaenoik asit ve eikosapentaenoik asitle BTZ dirençliliğine yönelik araştırma yapmıştır. Bileşenlerin hücrede NFκB aktivasyonu ile etkinlik gösterdiği ve hücrelere BTZ'den önce verilmesinin apoptozu arttırdığını saptanmıştır. Söz konusu çalışma MM tedavisinde NFκB aktivasyonunu işaret etmesi

açısından önemlidir. Çünkü TLR sinyal yolu nihayetinde NFkB aktivasyonuna yol açmaktadır. Çalışmamızda MM hücrelerinde Pam₃CSK₄ ligandı ile TLR sinyal yolunu aktifleştirmeyi ve bunu tedavide kullanmayı hedefledik.

Matulis ve ark. (2016), MM hastalarında VNT'nin CFZ ile kombinasyon etkinliğini belirlemek amacıyla 5 hücre hattında araştırma yapmıştır. 24 saatlik uygulamada 4 hücre hattında Apoptoz indüksiyonu olumlu etkilenmiştir. Araştırmada CFZ'in tekil kullanıma göre VNT ile kombine kullanımı IC₅₀ değerini önemli ölçüde dşrmştir. Deneylerimizde de benzer şekilde her 3 hücre hattımızda inhibitörlerin VNT kombinasyonları IC₅₀ değerlerini oldukça dşrmştir.

Kuhn ve ark. (2007), CFZ'in terapotik etkinliğini ilaçlara dirençli hücrelerde doza ve zamana bağlı araştırmıştır. Buna göre CFZ'nin DEX ile kombinasyonu oldukça güçlü anti-proliferatif etki göstermiş ve değerlendirilen tüm konsantrasyonlarda yüksek dereceli sinerji saptanmıştır. Bu verilerle uyumlu olarak deneylerimizde, en düşük IC₅₀ değerleri VNT'nin CFZ ve IXS ile kombinasyonlarında bulduk. Ayrıca Pam₃CSK₄ stimlasyonlu kltr koşullarında, inhibitörlerin tekil ve VNT ile kombine kullanımları kıyaslandığında IC₅₀ değerlerinde önemli bir düşüş belirledik. Böylelikle Pam₃CSK₄ stimlasyonlu kltr koşullarının proliferatif etkisinin VNT kombinasyonu ile anti-proliferatif etkiye dönüştüğü ve kombinasyonların güçlü bir sinerji oluşturduğunu gözlemledik.

Terzi ve ark. (2019), alternatif tedavi amacıyla BTZ'ye dirençli hücre hattında proteozom inhibitörü CFZ ile tirozin kinaz inhibitörü İbrutinib'in kombinasyonunu incelemiştir. Bulgularda CFZ inhibitörü için IC₅₀ değeri 24 saatlik uygulamada tekil kullanımda (81 μM) göre kombinasyonda (25 μM) daha düşük bulunmuştur. Benzer şekilde alışmamızda VNT ile yapılan CFZ kombinasyonlarında daha düşük IC₅₀ değerleri elde ettik. Ayrıca bir diğer BTZ türevi olan IXS'te de benzer sonuçları gözlemledik. IXS ve CFZ'nin IC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında, IXS'te daha düşük değerler elde edildi. Bu durum IXS'in gerek tekil kullanım gerekse VNT ile kombine kullanımda sitotoksik etkisinin daha güçlü olduğu şeklinde değerlendirilebilir.

5.2. Genlerin İfade Düzeyi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

5.2.1. Anti-apoptotik Genlerin İfade Düzeyi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Çeşitli içsel ve dışsal faktörlerle gelişen etkilere hücrel yanıt apoptotik bileşenler aracılığıyla düzenlenmektedir. Kontrollü hücre ölümünde en önemli hücrel bileşenlerden birisi BCL2 ailesi üyeleridir. Söz konusu bileşenler hücrede apoptozu destekleyen (Bax, Bak, Bid, BCLXS, Bad, Bik, Bim ve Hrk) ve apoptozu önleyen (BCL2, BCLXL, BCLW, BFL1/A1 ve MCL1) proteinlerden oluşmaktadır (Punnoose ve ark., 2016). Apoptoz önleyici proteinler mitokondriyal dış zarda, nükleer zarda veya endoplazmik retikulumda lokalizedir. Apoptoz destekleyici proteinler ise sitozolde veya hücre iskeletinde bulunur. Hücrenin hayatta kalması apoptozu önleyici ve destekleyici BCL2 ailesi proteinlerinin oranıyla belirlenir. Ölüm sinyali sonrasında apoptoz destekleyici proteinler konformasyonel değişikliğe uğrar ve mitokondriye transfer olur. Apoptoz destekleyici proteinler mitokondride doğrudan apoptoz yürütücüsü bileşenlere bağlanarak heterodimerler oluşturur. Böylelikle apoptoz önleyici BCL2 ailesi üyelerinin aktivitesi nötralize edilerek hücrel ölüm tetiklenir. Daha sonra mitokondriyal intermembran boşluğundan CytC vb. apoptojenik proteinlerin salınımı başlatılır. Sitozolik CytC, Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1'e (Apoptotic protease activating factor 1, APAF1) bağlanır ve kaspaz 3'ün kaspaz 9'a bağlı aktivasyonunu indükler. Bu uyarım nihayetinde hücre ölümüne yol açan anahtar proteinlerin parçalanmasını başlatır (Donk ve ark., 2005; Roberts ve ark., 2017).

Anti-apoptotik protein inhibitörlerinin MM tedavisinde kullanımını inceleyen Punnose ve ark. (2016) hücre ölümünde gösterge olarak kullanılabilecek apoptotik bileşenleri raporlamıştır. Buna göre hücrede terapi sonrasında *BCL2*, *BCLXL* ve *MCL1* ekspresyon düzeylerindeki değişimin kullanılabileceği, ve sırasıyla > 2.7 , < 5 , < 4.8 katlık değişimlerin tedaviye duyarlılıkla ilişkili olduğunu bildirmiştir. Ayrıca VNT'ye yönelik hücrel yanıtta en uygun öngörü araçlarının sırasıyla *BCL2*, *BCLXL* ve *MCL1* ekspresyonları olduğunu ifade etmiştir. Deneylerimizde gerek tekil gerekse kombine uygulamalarımızda *BCL2*, *BCLXL* ve *MCL1* ekspresyonlarındaki değişimleri inceledik. Bulgularımızı Punnose ve ark. (2016) tarafından belirlenen ölçütler çerçevesinde değerlendirdiğimizde

3 hücre hattında da CFZ'nin tekil ve kombine kullanımları IXS'e göre daha etkili oldu. Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarının inhibitörlerle birlikte kombinasyonu güçlü sinerik etki oluşturdu. Bu bağlamda en güçlü prediktör olan BCL2'nin U266 hücre hattında CFZ'nin üçlü kombinasyonunda elde ettiğimiz 9,6 katlık ekspresyon artışı örnek verilebilir.

5.2.1.1. **BCL2 Geni İfade Düzeyi Sonuçlarının Değerlendirilmesi**

MM hücrelerinin hayatta kalma ve ilaç dirençliliğine yönelik mekanizmaları değerlendiren Donk ve ark. (2005), *BCL2* ekspresyonunun hücre canlılığına etkisini raporlamıştır. Buna göre hem normal plazma hücrelerinde hem de MM plazma hücrelerinde yüksek *BCL2* ekspresyonu gözlenmekte olup MM hücrelerinde artışına neden olan özgün bir mutasyon bildirilmemiştir. Bunun yerine genin hipometilasyonu, gen transkripsiyonunu indükleyen NFκB'nin yapısal aktivitesi veya *BCL2* gen ekspresyonunu engelleyen p53 tümör baskılayıcının kaybı gibi mekanizmaların etkili olabileceğini ifade edilmiştir. Araştırmacılar, *BCL2* gen ürününün hücrede apoptozu önleyerek transformasyona ve ilaç dirençliliğine destek olduğunu ifade etmiştir.

Deneylerimizde, CFZ içerikli kombinasyonlarda *BCL2* ekspresyonu için genel itibariyle artış söz konusuydu. CFZ'nin tekil kullanımında 3 hücre hattında da artış gözlenmekle birlikte, VNT'nin kültüre dahil edilmesi *BCL2* ekspresyonunda azalışa neden oldu. CFZ'nin tekil kullanıldığı Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında NCI H929 hücre hattında önemli azalma gözlemlendi. Diğer taraftan CFZ/VNT kombinasyonlu Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşulları 3 hücre hattında da artışa neden oldu. IXS içerikli kombinasyonlarda ise *BCL2* ekspresyonunda azalma gözlemledik. Buna göre en önemli azalmayı IXS'in tekil kullanımında NCI H929 hücre hattında, IXS/VNT kombinasyonunda RPMI 8226 hücre hattında gözlemledik. Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşulları, hem IXS hem de IXS/VNT kombinasyonuna dahil edildiğinde *BCL2* ekspresyonunda artışa neden oldu.

Matulis ve ark. (2014), MM tedavisi ajanı DEX'in VNT ile kombine kullanımına uygunluğunu hücre hatlarında ve primer hasta örneklerinde incelemiştir. Bulgularında *BCL2* ekspresyonunun DEX tekil kullanımında arttığı ve hücrelerin BCL2'ye bağımlı

duruma geldiği ifade edilmiştir. Bu aşamada gerçekleştirilen VNT kombinasyonu ile *BCL2* ekspresyonundaki azalma güçlü sinerjik etki olarak yorumlanmıştır. Deneylerimizde U266 ve RPMI 8226 hücre hatlarında IXS'le benzer veriler elde ettik. Buna göre *BCL2* ekspresyonları IXS tekil kullanımında, IXS/VNT kombinasyonlu kullanımına göre daha yüksek saptandı. IXS/VNT kombinasyonuna Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarının dahil edilmesiyle aynı değerlerde daha fazla azalma saptandı. Bu durum IXS için VNT ve Pam₃CSK₄ ile üçlü kombinasyonun daha güçlü bir sinerjik etki oluşturması olarak yorumlanabilir. Diğer taraftan, CFZ inhibitörüyle 3 hücre hattında *BCL2* ekspresyonunda artış saptandı. Kültür koşullarına VNT'nin ilave edilmesiyle bu değerlerde azalma gözlemlendi. Ancak ilginç şekilde CFZ/VNT kombinasyonuna Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarının dahil edilmesiyle *BCL2* ekspresyonunda artış gözlemlendi. Bu durum IXS'ten farklı olarak CFZ'nin VNT ile kombinasyonunun uygun olduğu, ancak Pam₃CSK₄ stimülasyonlu üç kombinasyonlu kültür koşullarının uygun olmaması şeklinde yorumlanabilir.

Apoptotik protein inhibisyonunun MM tedavisindeki kullanımını inceleyen Punnoose ve ark. (2016), primer hasta örneklerinde yüksek seviyeli *BCL2* ekspresyonu olduğunu raporlamış ve inhibisyonunu alternatif tedavi olarak önermiştir. VNT uygulamasında artan *BCL2* ekspresyonunun hücrenin tedaviye duyarlılığında önemli bir gösterge olduğunu ve 2.7 kattan fazla artışların duyarlılıkla ilişkisini ifade etmiştir. Deneylerimizde *BCL2* ekspresyonundaki benzer bir artışı U266, RPMI 8226 ve NCI H929 hücre hatlarında elde ettik. Buna göre Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarının CFZ ve IXS'in tekil formlarından daha yüksek ekspresyon artışına yol açması önemlidir. U266 hücrelerinde özellikle CFZ'nin üçlü kombinasyonunda belirgin anlamlı bir ekspresyon artışı gözlemlendi. RPMI 8226 hücrelerinde en etkili artışı üçlü kombinasyonda saptadık. Bu durum kombinasyon bileşenlerinin tekli veya ikili formda gözlenen düşük değerlerin üçlü kombinasyonun sinerjik etkisiyle arttırıldığını ortaya koymaktadır. NCI H929 hücrelerinde CFZ'nin yanısıra IXS üçlü kombinasyonunda da anlamlı bir artış mevcuttu ancak 2.7 katlık artıştan düşüktü.

Apoptoz önleyici proteinlerin selektif inhibisyonunu hücre hatlarında ve MM hastalarında inceleyen Seiller ve ark. (2020), hastalarda *BCL2* ekspresyonunun ve

duyarlılığının değişkenliğini raporlamıştır. Ayrıca VNT dirençli hastanın primer hücrelerine *ex vivo* alternatif tedavi yöntemi uygulamış ve kombine kullanımın tekil kullanıma göre daha efektif olduğunu ifade etmiştir. Deneylerimizde benzer şekilde *BCL2* ekspresyonunda oldukça heterojen bir dağılım gözlemledik. CFZ'nin tekil kullanımında U266 ve NCI H929 hücre hatlarında artış gözlemledik. IXS'in tekil kullanımında sadece NCI H929 hücre hattında anlamlı bir azalma belirlendi. CFZ'nin Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarındaki uygulamasında tekil kullanımına göre daha düşük değerler elde edildi ve NCI H929 hücrelerinde istatistiksel olarak önemli 4.1 katlık azalma belirlendi. IXS'in Pam₃CSK₄ ile kombinasyonu 3 hücre hattında da anlamlı bir azalmaya neden oldu ve güçlü sinerji olarak değerlendirildi. CFZ'nin VNT kombinasyonlarında da benzer bir azalma olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı tek değer U266 hücre hattındaki 1.5 katlık artış değeri idi. IXS/VNT kombinasyonunda anlamlı azalma sadece RPMI 8226 hücrelerinde saptandı. CFZ'nin üçlü kombinasyonunda 3 hücre hattında da *BCL2* ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlemlendi ve uygun olmayan sinerji olarak değerlendirildi. Özellikle U266 hücre hattındaki 9.6 katlık anlamlı artış hücrelerin tedaviye gösterdiği dirençlilik olarak yorumlandı. Nitekim Seiller ve ark. (2020) aynı çalışmalarında U266 hücrelerinin VNT'ye dirençlilik gösterdiğini ve kombine tedavinin xenograft modelde başarılı olduğunu ifade etmiştir. IXS'in üçlü kombinasyonunda ise anlamlı azalma sadece RPMI 8226 hücrelerinde mevcuttu. Sonuç olarak tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde *BCL2* ekspresyonundaki azalma açısından en uygun kombinasyonun CFZ'de Pam₃CSK₄ stimülasyonlu koşullar, IXS'te VNT ile kombinasyon olarak belirlendi.

Moreau ve ark. (2017), tedaviye dirençlilik geliştirmiş MM hastalarında hücre canlılığına destek olan apoptoz önleyici proteinleri incelemiştir. Araştırmalarında VNT'nin bulunduğu üçlü bir kombinasyon terapisiyle hücresel yanıt değerlendirilmiştir. 45 hastadan oluşan grupta, tedaviye olumlu yanıt veren (33) ve vermeyen (12) bireylerin ekspresyonları karşılaştırılmıştır. Tedaviye yanıt veren grupta *BCL2* ekspresyonu daha yüksek bulunmuş ve 3 kattan fazla artış olumlu hücresel tepki olarak raporlanmıştır. Deneylerimizde CFZ'nin üçlü kombinasyonlarında buna benzer bir artışı gözlemledik.

Özellikle U266 hücrelerinde 9,6 katlık, RPMI 8226 hücrelerinde 2,6 katlık bir artış söz konusuydu. IXS ile yapılan kombinasyonlarda ise genel olarak bir azalma mevcuttu.

5.2.1.2. ***BCLXL* Geni İfade Düzeyi Sonuçlarının Değerlendirilmesi**

MM hücrelerinin hayatta kalması ve ilaç dirençliliğine yönelik literatür değerlendirmesi yapan Donk ve ark. (2005) *BCLXL*'nin miyelom hücrelerindeki öneminden bahsetmiştir. Buna göre *BCLXL* hücrede önemli apoptoz önleyici genlerden birisidir. Hastalarda, ekspresyonundaki azalma apoptozun indüklenmesi, kemoterapötik ajanların sitotoksik etkilerinin artması ve tedaviye duyarlılıkla ilişkilendirilmiştir. Diğer taraftan, relaps gelişen hastalarda *BCLXL* ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. Deneylerimizde bu verilerle uyumlu olarak U266 ve NCI H929 hücre hatlarında önemli azalmalar saptadık. Özellikle en güçlü azalmaları U266 hücrelerinde hem CFZ hemde IXS'in üçlü kombinasyonlarında gözlemledik. NCI H929 hücrelerinde IXS'in üçlü kombinasyonunda güçlü azalma gözlenmekle birlikte, CFZ'de VNT ikili kombinasyonunda azalma saptandı. RPMI 8226 hücrelerinde ise bunlara zıt biçimde *BCLXL* ekspresyonunda artışlar söz konusuydu.

DEX ve VNT'nin kombine kullanımına uygunluğunu Matulis ve ark. (2016), hücre hatlarında ve primer hasta örneklerinde incelemiştir. Bulgularında mRNA düzeyindeki *BCLXL* ekspresyonunu 2 hücre hattından birinde artış diğerinde azalış olarak raporlamıştır. Söz konusu değişim DEX ve VNT'nin tekil kullanımlarına göre kombine kullanımda sinerjik etki gösterdiğini belirlemiştir. Ayrıca kombine kullanımda *BCLXL* ekspresyonunun protein düzeyinde her iki hücre hattında azaldığı raporlanmıştır. Deneylerimizde *BCLXL* ekspresyonu için mRNA düzeyinde U266 ve NCI H929 hücre hatlarında benzer azalmalar saptadık. Buna göre CFZ ve IXS'in tekil kullanımlarında gözlenen ekspresyon değerleri VNT ile kombine kullanımlarında daha düşük bulundu. Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarına VNT'nin kombinasyonu ile U266 hücre hattında daha düşük değer elde edildi. Ancak Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşulları NCI H929 hücre hattında *BCLXL* ekspresyonunda ilave bir azalamaya neden olmadı. Diğer taraftan RPMI 8226 hücre hattında CFZ ve IXS'in tekil kullanımda *BCLXL* ekspresyonu için artış gözlemledik. VNT kombinasyonun yapılması CFZ'de önemli

olmayan bir azalışa, IXS'te ise artışa neden olduğu gözlemlendi. Bu durum Matulis ve ark. (2016)'nın gözlemlediği mRNA seviyesindeki artış ve protein seviyesindeki azalışla benzerlik göstermesi olasıdır.

BCL2 ailesi inhibitörlerini hücre hatları ve primer hasta örneklerinde değerlendiren Punnoose ve ark. (2016), VNT'ye duyarlılıkta *BCLXL*'nin ters oranlı olarak önemli bir gösterge olduğunu ifade etmiştir. Deneylerimizde U266 hücre hattında hem CFZ hem de IXS uygulamalarında *BCLXL* ekspresyonunda azalma gözlemledik. Kombinasyonda Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarının olması azalmada önemli bir faktördü. Çünkü ikili ve üçlü kombinasyonlar kıyaslandığında Pam₃CSK₄ stimülasyonu, VNT'ye göre daha fazla azalmaya neden oldu. Böylelikle üçlü kombinasyon U266 hücre hattında oldukça etkili sinerji sağladı. Benzer bir durum NCI H929 hücre hattında IXS kombinasyonları için gözlemlendi. Ancak ikili kombinasyonlarda Pam₃CSK₄ stimülasyonu ve VNT açısından belirgin bir fark bulunmadı. NCI H929 hücre hattında, CFZ kombinasyonlarında da azalma görülmekle birlikte üçlü kombinasyon etkili bir azalmaya neden olmadı. RPMI 8226 hücre hattında ise CFZ ve IXS kombinasyonlarında *BCLXL* ekspresyonunda belirgin bir artış gözlemlendi. U266 ve NCI H929 hücre hatlarının aksine Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşulları, VNT ve inhibitörün üçlü kombinasyonu en büyük artışa neden oldu. *BCLXL* ekspresyonu açısından tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde, üçlü kombinasyonumuz RPMI 8226 hücre hattında olumsuz, U266 ve NCI H929 hücre hatlarında olumlu yanıt gösterdi. İki hücre hattında benzer etki gösterdiği için IXS, CFZ'ye göre sinerjik etkiye daha uygun bulundu.

Seiller ve ark. (2020) apoptotik protein inhibitörlerini değerlendirdikleri çalışmalarında VNT'nin kombine kullanımının apoptotik etkinliği arttıracakı ifade etmiştir. Araştırmalarında dirençli hastalarda yeni VNT kombinasyonu başarılı biçimde uygulamış ve tümör hücrelerinde *BCLXL* gen ürününün en önemli apoptoz önleyici faktör olduğunu belirlemiştir. Buna göre alternatif tedavi metodunda hücredeki *BCLXL*'nin ekspresyonunun 3.9 kat arttığı bulunmuştur. Deneylerimizde benzer bir artış RPMI 8226 hücre hattında hem CFZ (3.4 kat) hem de IXS'in (2.5 kat) kombinasyonlarında gözlemlendi. Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarının tekil ve kombinasyonlarında da artış mevcuttu. Diğer taraftan, U266 ve NCI H929 hücre hatlarında *BCLXL* ekspresyonunda

belirgin bir azalma gözlemlendi. Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşulları U266 hücrelerinde tüm uygulamalara olumlu katkı sundu. Ancak NCI H929 hücre hattında sadece IXS'in üçlü kombinasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi. Tüm veriler göze alındığında, kombinasyonlarımız *BCLXL* ekspresyonunda belirgin bir azalmaya neden oldu. RPMI 8226 hücre hattında Seiller ve ark. (2020)'nin tedaviye dirençlilikle ilişkilendirdiği *BCLXL* ekspresyon artışı saptandı.

Dirençli MM hastalarında VNT içerikli yeni bir kombine terapiyi değerlendiren Moreau ve ark. (2017), uygulamanın güvenli profile ve etkinliğe sahip olduğunu raporlamıştır. Araştırmacılar *BCLXL* ekspresyonunu hasta gruplarında kıyaslamış ve tedaviye yanıt verenlerde vermeyenlere göre daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Ancak *BCLXL* ekspresyonundaki değişim tedaviye yanıtla ilişkilendirilmemiştir. Bulgularımızda bu verilerin aksine CFZ ve IXS uygulamaları için U266 ve NCI H929 hücre hatlarında önemli ekspresyon azalmaları gözlemledik. U266 hücrelerinde en fazla azalma üçlü kombinasyonda bulundu. Bu durum üçlü kombinasyonun sinerjik etkinliği olarak değerlendirildi. Benzer bir profil NCI H929 hücrelerinde IXS'in üçlü kombinasyonu için mevcuttu. Ancak CFZ için VNT ile yapılan ikili kombinasyonda anlamlı bir azalma bulundu. Diğer taraftan, RPMI 8226 hücrelerinde *BCLXL* ekspresyonunda artma söz konusuydu. Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarındaki artış gerek CFZ gerekse IXS'in ikili ve üçlü kombinasyonlarında belirli ölçüde saptandı.

5.2.1.3. *MCL1* Geni İfade Düzeyi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

MM patofizyolojisine yönelik inceleme yapan Donk ve ark. (2005) raporlarında *MCL1* gen ekspresyonunun miyelom hücrelerindeki öneminden bahsetmiştir. Buna göre *MCL1*'in sağlıklı hücrelerde proliferasyon, stres ve farklılaşma gibi kritik olaylarda hücre canlılığının kısa sürede hızlı indüklenmesine aracılık ettiğini belirtmiştir. Ancak normal hücrelerdeki kısa süreli ekspresyonuna rağmen MM hücrelerinde kontrolsüz ve süreğen ekspresyonu, hücrenin hayatta kalmasına, tümörojenik dönüşümüne ve sitotoksik ilaçlara karşı dirençliliğine kaynaklık etme potansiyelini ifade etmiştir. Ekspresyonun, normal plazma hücrelerine göre miyelom hücrelerinde ve relaps hastalarında arttığı ve artan ekspresyonun tümör progresyonuyla ilişkisini göstermiştir.

Bulgularımızda *MCL1* gen ekspresyonu açısından U266 hücre hattında azalma, RPMI 8226 ve NCI H929 hücre hatlarında artış gözlemledik. U266 hücrelerinde Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarının belirgin bir etkisi olmamakla beraber, CFZ ve IXS'in VNT kombinasyonları güçlü bir sinerji oluşturdu. RPMI 8226 ve NCI H929 hücrelerinde hem CFZ hem de IXS'in tüm uygulamalarında artış saptadık. VNT ve Pam₃CSK₄ stimülasyon kombinasyonlarında artış yönünde değişim oldu ve en yüksek artış üçlü kombinasyonda bulundu. Sonuç olarak *MCL1* gen ekspresyonunda azalma açısından tekil ve kombine ilaç uygulamalarında uygun sinerjik yanıt sadece U266 hücrelerinde gözlemlendi.

Matulis ve ark. (2016), VNT'nin etkinliğini belirlemek amacıyla 2 hücre hattında ve primer hasta örneklerinde apoptoz indüksiyonunu incelemiştir. Çalışmada, DEX ve VNT'ye bağlı *MCL1* ekspresyonunun mRNA düzeyinde 2 hücre hattından birisinde artış diğerinde azalış olarak raporlamıştır. İlaçların tekil kullanımlarına göre kombine kullanımda sinerjik etki gösterdiği raporlanmıştır. Deneylerimizde *MCL1* ekspresyonunda azalışı U266 hücre hattında, artışı RPMI 8226 ve NCI H929 hücre hatlarında gözlemlendi. U266 hücre hattında VNT kombinasyonlarında belirlenen azalmanın CFZ ve IXS'in tekil kullanımlarına göre daha fazla olması sinerjik etki olarak değerlendirilebilir. Ancak Pam₃CSK₄ stimülasyonlu üçlü kombinasyon önemli bir ilave azalamaya neden olmadı. Diğer taraftan, RPMI 8226 hücre hattında Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarının VNT ile üçlü kombinasyonları *MCL1* ekspresyonunda önemli artışa neden oldu. Benzer bir durum NCI H929 hücre hattında CFZ/VNT/Pam₃CSK₄ üçlü kombinasyonunda gözlenmiş olup, IXS'te sadece tekil kullanımda saptandı. Bu sonuçlar, *MCL1* ekspresyonunda her bir hücre hattının özgün bir yanıt oluşturması olarak değerlendirilebilir.

Apoptotik proteinleri hedef alan antagonistleri değerlendiren Punnoose ve ark. (2016), VNT uygulamasında *MCL1* gen ekspresyonunda azalma gözlemlemiş ve 4.8 kattan daha düşük değerleri tedaviye duyarlılıkla ilişkilendirmiştir. Bulgularımızda CFZ'nin tekil ve kombine uygulamalarında söz konusu eşik değerden daha düşük sonuçlar elde edildi. En fazla azalma U266 hücre hattında gözlenmiş olup, özellikle CFZ/VNT ikili kombinasyonundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bu uygulamalarda

Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarının *MCL1* ekspresyonuna belirgin bir etkisi gözlenmedi. Diğer taraftan, RPMI 8226 ve NCI H929 hücre hatlarındaki CFZ'nin tekil ve kombine uygulamalarında *MCL1* ekspresyonunda artış gözlenmekle birlikte söz konusu değerler Punnoose ve ark. (2016)'nın belirlediği eşik değerden daha düşüktü. IXS'in tekil ve kombine uygulamaları için U266 hücre hattında azalan *MCL1* ekspresyonları saptandı. RPMI 8226 ve NCI H929 hücre hatlarının tekil ve ikili kombinasyonlarında Punnoose ve ark. (2016)'nın eşik değerinden daha düşük ekspresyonlar belirlendi. Ancak RPMI 8226 hücrelerinde üçlü kombinasyonda *MCL1* ekspresyonu için daha yüksek bir değer gözlendi ve Pam₃CSK₄'ün dahil edilmesi sinerjik bir etki oluşturmadi. NCI H929 hücrelerinde ise IXS'in VNT ile kombinasyonu olumlu bir etki oluşturmakla birlikte, aynı sisteme Pam₃CSK₄'ün dahil edilmesi *MCL1* ekspresyonu açısından daha güçlü bir sinerjik etkinin oluşmasını sağladı.

MM patoloji ve direnç mekanizmalarını inceleyen Seiller ve ark. (2020) primer örneklerde *MCL1* ekspresyonuna bağlı canlılığın önemini belirtmiş ve artmış ekspresyonun tedaviye dirençlilikle ilişkili olduğu ifade etmiştir. VNT tedavisi alan ve dirençlilik gelişmiş bir hastada yapılan analizde en yüksek ekspresyon seviyesi *MCL1*'de saptanmış ve dirençli MM hücrelerinin *ex vivo* kombine inhibitör tedavisinde olumlu sinerjik etki gözlenmiştir. Deneylerimizde CFZ ve IXS uygulamalarında *MCL1* ekspresyonu açısından U266 hücre hattında azalma, RPMI 8226 ve NCI H929 hücre hatlarında artma söz konusuydu. U266 hücrelerinde CFZ ve IXS'in VNT kombinasyonları istatistiksel olarak anlamlı ekspresyon azalmalarına neden oldu. Ancak Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşullarının dahil edildiği üçlü kombinasyonda azalma olmasına rağmen istatistiksel bir önem belirlenmedi. RPMI 8226 hücrelerinde tüm uygulamalarda gözlenen artış özellikle Pam₃CSK₄ stimölasyonlu üçlü kombinasyonda en fazla anlamlı artışa neden oldu. NCI H929 hücrelerinde Pam₃CSK₄ stimölasyonlu költür koşulları *MCL1* ekspresyonunda anlamlı bir artışa neden olmakla birlikte, CFZ ile ikili kombinasyonu azalmaya, IXS ile ikili kombinasyonu artışa neden oldu. Üçlü kombinasyonlarda ise CFZ'de anlamlı bir artış IXS'te anlamlı olmayan bir azalma mevcuttu.

MM hastalarında VNT ile yeni bir kombinasyon terapisini inceleyen Moreau ve ark. (2017), *MCL1* ekspresyonunu tedaviye yanıt veren ve vermeyen hasta gruplarında değerlendirmiştir. *MCL1* ekspresyonundaki değişim tedaviye yanıtla ilişkilendirilmemekle birlikte, tedaviye yanıt veren hasta grubunda daha yüksek olduğu raporlanmıştır. Elde ettiğimiz verilerde, *MCL1* ekspresyonu açısından genel olarak RPMI 8226 ve NCI H929 hücre hatlarında artış, U266 hücre hattında azalma mevcuttu. En yüksek artış RPMI 8226 hücrelerinde CFZ ve IXS'in üçlü kombinasyonlarında bulundu. Benzer bir durum NCI H929 hücrelerinde CFZ kombinasyonlarında gözlemlendi ancak IXS'te sadece Pam₃CSK₄ stimülasyonlu uygulamada saptandı. U266 hücrelerinde ise diğerlerinden farklı olarak CFZ ve IXS'in VNT ile ikili kombinasyonlarında anlamlı bir azalma söz konusuydu.

5.2.2. Apoptotik Gen İfade Düzeyi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Hücrede apoptozun gerçekleşmesi özgün proteinlerin ekspresyonuna, translasyon sonrası modülasyonlarına, belirli hedeflerin indüksiyonuna ve proteinsel etkileşimlerin sağlanmasına bağlıdır (Roberts ve ark., 2017). Bu süreçte kaspazlar programlanmış hücre ölümünün önemli araçlarıdır ve hücrede farklı çeşitleri görev almaktadır. Kaspaz 3, apoptozda efektör olarak kullanılan ortak ölüm proteazıdır ve proteolitik degradasyonun başlıca yürütücüsüdür (Porter ve Jänicke, 1999). Kaspaz 3 hücrede inaktif formda bulunur ve proteolitik işleme sonrası aktif forma dönüştürülür. Hücre ölümü ve apoptozu düzenleme etkinliğiyle birçok karsinogeneizde değerlendirilmiştir. Tümör hücrelerinde ekspresyonundaki azalma kanser tedavisine dirençle sonuçlanmaktadır (Huang ve ark., 2018). Deneylerimizde, ekspresyon açısından göreceli olarak U266 hücre hattında azalan değerler, RPMI 8226 ve NCI H929 hücre hatlarında artan değerler gözlemledik. U266 hücrelerinde istatistiksel olarak önemli ve belirgin bir ekspresyon azalmasına CFZ'nin tekil uygulamasında saptandı. IXS'in tekil uygulamasında azalma olmakla birlikte üçlü kombinasyonda en düşük ekspresyon değeri belirlendi. RPMI 8226 hücrelerinde CFZ ve IXS'in tekil uygulamalarına göre Pam₃CSK₄ stimülasyonlu ikili uygulamalarda önemli artış saptandı. Benzer bir durum VNT ile yapılan ikili kombinasyonlarda gözlenmemesine rağmen, en yüksek ekspresyon değerleri üçlü kombinasyonda belirlendi. Bu durum RPMI 8226 hücrelerinde kombinasyonun güçlü sinerjisi olarak

değerlendirildi. NCI H929 hücrelerinde CFZ'nin tüm uygulamalarında anlamlı ekspresyon artışları mevcuttu. CFZ'nin tekil uygulamasına göre Pam₃CSK₄ stimülasyonlu koşullarının ikili kombinasyonu olumlu, VNT'nin ikili kombinasyonu olumsuz bir etkiye neden oldu. Ancak CFZ'nin üçlü kombinasyonda güçlü bir sinerji gözlemlendi ve en yüksek ekspresyon değeri bulundu. NCI H929 hücrelerinde IXS ve kombinasyonlarının etkinliği büyük oranda CFZ'ye benzemekle birlikte, üçlü kombinasyonda zıt biçimde güçlü bir sinerji gözlenmedi.

5.2.2.1. **CASP3 Geni İfade Düzeyi Sonuçlarının Değerlendirilmesi**

MM hastalarında alternatif terapi ajanlarına yönelik inceleme yapan Kuhn ve ark. (2007), CFZ'nin tedavi dirençliliğe karşı kullanılabilecek önemli bir ajan olduğunu raporlamıştır. Araştırmacılar, CFZ'nin MM modelinde apoptozu hem içsel hem de dışsal yollar aracılığıyla başlattığını ve kaspaz 3 aktivitesini arttırdığını göstermiştir. Deneylerimizde bu verilerle uyumlu olarak *Kaspaz 3* gen ekspresyonu açısından RPMI 8226 ve NCI H929 hücre hatlarında ekspresyon artışı gözlenmekle birlikte, U266 hücre hattında daha düşük değerler elde ettik. U266 hücrelerinde CFZ'nin tekil uygulaması en yüksek ekspresyon değerini verdi ve diğer uygulamalarında sinerjik bir etki gözlenmedi. RPMI 8226 hücrelerinde hem CFZ hem de IXS uygulamalarında istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlemlendi. Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarının CFZ ve IXS uygulamalarında belirgin artışlar saptandı. VNT'nin ikili kombinasyonlarda önemli bir etki oluşmadığı halde, üçlü kombinasyonda en yüksek ekspresyon değerleri elde edildi. Böylelikle RPMI 8226 hücrelerinde üçlü kombinasyon güçlü sinerji gösterdi. NCI H929 hücrelerinde CFZ'nin tüm uygulamalarında istatistiksel olarak anlamlı artış mevcuttu. İkili kombinasyonlarda CFZ'nin tekil kullanımına göre Pam₃CSK₄ stimülasyonu olumlu, VNT kombinasyonu olumsuz etki oluşturdu. Ancak CFZ'nin üçlü kombinasyonu güçlü bir sinerji gösterdi ve en yüksek *Kaspaz 3* ekspresyonu elde edildi. IXS'in üçlü kombinasyonunda benzer bir güçlü sinerji gözlenmemesine rağmen diğer tekil ve ikili uygulamalarında artışlar mevcuttu. Özellikle Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşulları IXS ile sinerji gösterdi ve ekspresyonda anlamlı bir artış saptandı.

Punnoose ve ark. (2016), BCL-2 ailesi proteinlerini hedefleyen VNT antagonistinin etkinliğini hücre hatlarında değerlendirmiş ve VNT'nin gerek tekil gerekse diğer konvansiyonel ilaçlarla kombine olarak kullanılabileceğini ifade etmiştir. Araştırmalarında 50 nM konsantrasyonda monoterapik olarak uygulanan VNT'nin kaspaz 3 aktivitesini KMS-34 ve MM.1S hücre hatlarında sırasıyla 2.6 kat ve 5.4 kat arttırdığı raporlamıştır. Deneylerimizde CFZ ve IXS ile yapılan VNT kombinasyonlarında *Kaspaz 3* ekspresyonu açısından belirgin bir artış gözlemlenemedi. U266 hücrelerinde VNT'nin ikili ve üçlü kombinasyonlarında oldukça düşük değerler saptadık. Bu durum kombine tedavinin etkili olmaması ve hücrelerin tedaviye dirençliliği olarak değerlendirildi. Diğer taraftan RPMI 8226 ve NCI H929 hücrelerindeki üçlü kombinasyonlarda oldukça yüksek değerlerde anlamlı ekspresyon artışları saptandı. Buna göre RPMI 8226 hücrelerinde hem CFZ'nin hem de IXS'in üçlü kombinasyonunda güçlü sinerji gözlemlendi ve en yüksek değerler bulundu. NCI H929 hücrelerinde ise benzer güçlü sinerji sadece CFZ'de belirlendi.

MM tedavisine dirençliliği apoptotik yollar açısından inceleyen Öksüzoğlu ve Kozalak (2021), apoptozu baskılayan faktörleri ortadan kaldırmanın yeni bir tedavi metodu olabileceğini ifade etmiştir. Araştırmada BTZ uygulamasıyla *kaspaz 3* genindeki ekspresyon değişiminin duyarlı hücrelerde 2,5 kat, dirençli hücrelerde 1,6 kat arttığı raporlanmıştır. Bulgularımız bu verilerle karşılaştırıldığında yeni kombinasyonlarla U266 hücre hattında belirgin bir değişimin olmadığı, ancak RPMI 8226 ve NCI H929 hücre hatlarında olumlu sinerji geliştiği belirlendi. U266 hücrelerinde istatistiksel olarak önemli en güçlü ekspresyon artışı sadece CFZ'nin tekil uygulamasında gözlemlendi ve diğer ikili, üçlü kombinasyonların olumlu bir katkısı saptanmadı. Diğer taraftan, RPMI 8226 hücrelerinde hem CFZ hem de IXS'in tekil kullanımlarına göre Pam₃CSK₄ stimülasyonlu ikili kombinasyon güçlü sinerji gösterdi ve ekspresyonda belirgin bir artış sağladı. İlginç şekilde, VNT'nin ikili kombinasyonlarında CFZ'de olumsuz yönde, IXS'te olumlu yönde bir değişim gözlenmesine rağmen, üçlü kombinasyonda her iki inhibitörde oldukça güçlü ve istatistiksel olarak anlamlı artışa neden oldu. NCI H929 hücrelerinin CFZ uygulamalarında RPMI 8226 hücrelerine benzer bir profil gözlemlendi. Buna göre CFZ'nin tekil uygulamasına göre Pam₃CSK₄ stimülasyonlu ikili kombinasyon olumlu VNT ikili

kombinasyon olumsuz bir etki oluşturdu. Üçlü kombinasyonda ise en güçlü ve istatistiksel olarak alamlı ekspresyon artışı bulundu. NCI H929 hücrelerinin IXS uygulamalarında tekil kullanıma göre Pam₃CSK₄ ile ikili kombinasyonun olumlu, VNT ile ikili kombinasyonun olumsuz etkisi gözlemlendi. Ancak üçlü kombinasyonda sinerjik olmayan bir sonuç elde edildi ve ekspresyon artışı saptanmadı.

5.2.3. Toll Like Reseptörleri 1/2 Sinyal Yolu Bileşeni Genlerin İfade Düzeyi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

TLR1/2 reseptörleri ligandlarıyla etkileşim gösterdiğinde sırasıyla MyD88, IRAK4 ve TRAF6 adaptör moleküllerini kullanarak NFκB aktivasyonu sağlanmaktadır (Martínez ve ark., 2017). NFκB aktivasyonu MM hücrelerinde kanserleşme, anjiyogenez ve tümör mikroçevre etkileşiminin düzenlenmesinde kritik rollere sahiptir (Wong ve ark., 2020). Bu bağlamda TLR1/2 aracılığıyla gelişen NFκB situmülasyonunun birincil etkisi, inflamatuvar sitokinlerin, çeşitli medyatörlerin, adezyon moleküllerinin üretilmesiyle hücre canlılık artışının teşvik edilmesidir (Roy ve ark., 2018).

Günümüzde MM tedavisinde BTZ, CFZ ve IXS kullanımı öne çıkmaktadır (Ito, 2020). Bu ajanların ilk versiyonu olan BTZ'nin kanser tedavisindeki kullanımı NFκB aktivasyonu üzerindeki inhibitör etkisiyle kliniğe girmiştir ve hâlihazırda alternatif formları aynı etkinliğe farklı derecelerde sahiptir (Vrábel ve ark., 2019). Pİ'ler hücrede NFκB aktivasyonunu kanonikal olan ve olmayan yolları proteozomal degradasyon aracılığıyla baskılanmaktadır (Gandolfi ve ark., 2017). Ancak Hideshima ve ark. (2009), BTZ'nin proteozomal degradasyon üzerinden NFκB aktivasyonunu baskılamasının yanısıra, özgün bileşenlerle kanonikal NFκB aktivasyonunu indükleme potansiyelini bildirmiştir. Böylelikle NFκB'nin MM tedavisinde tümör destekleyici özelliklerinin inhibisyonuna, apoptoz destekleyici özelliklerinin aktivasyonuna yönelik araştırmalar önem kazanmıştır (Vrábel ve ark., 2019). Bu veriler sayesinde Li ve ark. (2010), BTZ'nin calpain inhibitörleri ile birlikte kullanımının apoptoz indükleyici aktiviteyi artırılabilceğini göstermiştir.

Tez çalışmamızda bu verilerle aynı doğrultuda TLR1/2 ve NFκB aktivasyon yollarının etkileşimini tümör hücrelerini apoptoza yönlendirmek için birleştirmeyi amaçladık.

Aliprantis ve ark. (2000) tarafından TLR1/2'nin stimülasyonunun hücrede ölüm reseptörü olarak etkinlik gösterebileceğini raporlamıştır. Ancak bu süreçte NFκB aktivasyonunu inhibe edici ajanın kullanımının gerekliliğini bildirmiştir. Nitekim, TLR1/2 situmulasyonu MyD88 adaptöründen sonra doğrudan FAS ilişkili ölüm domaini (FADD) aracılığıyla hücrede apoptoz başlatılabilmektedir (Salaun ve ark., 2006). Bizde araştırmamızda MM hücrelerine TLR1/2 stimülasyonlu kültür koşullarında Pİ'lerin NFκB aktivasyonu üzerindeki inhibisyonunun apoptozu arttırıcı etki göstermesini hedefledik. Ayrıca kemoterapik ajanların etkinliğini arttırmak için yakın dönemde KLL hastalarının tedavisinde kullanıma giren ve MM hastalarının tedavisindeki kullanımı incelenen apoptoz indükleyici VNT inhibitörünü kombinasyonlarımızda kullandık. VNT'nin farklı kemoterapik ajanlarda kombine kullanım etkinliği kanıtlanmış olup, MM tedavisine güçlü bir potansiyel sunmaktadır (Algarín ve ark., 2020; Wang ve ark., 2020).

5.2.3.1. IRAK4 Geni İfade Düzeyi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

MM tedavisinde alternatif metod üretmek amacıyla Kozanoğlu ve ark. (2013) NFκB aktivasyonunu uyarıcı agonistle hücre yanıtını değerlendirmiştir. Araştırmalarında agonistin MM hücreleri üzerinde anti-proliferatif ve apoptotik etkileri olduğunu raporlamıştır. Situmulasyonun NFκB aktivasyonunda görevli bileşenlerin ekspresyonunu etkilediği, bunlardan IRAK4 ile kompleks oluşturan IRAK1 ekspresyonunun artan agonist konsantrasyonuna bağlı olarak azaldığı bildirilmiştir. Bulgularımızda Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında *IRAK4* gen ekspresyonu U266 hücre hattında azalma, RPMI 8226 ve NCI H929 hücre hatlarında artış olarak gözlemlendi. Pam₃CSK₄ stimülasyonuna proteozom inhibitörünün dahil edildiği ikili kombinasyonlarda ise zıt değişimler saptandı. Buna göre CFZ ikili kombinasyonunda U266 hücrelerinde artma, RPMI 8226 ve NCI H929 hücrelerindeki ekspresyonda azalma bulundu. IXS ve Pam₃CSK₄ stimülasyonu ikili kombinasyonunda benzer bir değişim gözlenmekle birlikte NCI H929 hücrelerinde farklı olarak artış bulundu. VNT'nin dahil edildiği üçlü kombinasyonda CFZ uygulamaları için 3 hücre hattında da en yüksek ekspresyon değerleri elde edildi. Ancak IXS'in üçlü kombinasyonlarında U266 ve NCI H929 hücrelerinde en düşük, RPMI 8226 hücrelerinde en yüksek ekspresyon değerleri elde edildi. Böylelikle *IRAK4* gen ekspresyonu açısından en düşük değerler IXS'in üçlü

kombinasyonlarında U266 ve NCI H929 hücrelerinde gözlemlendi. RPMI 8226 hücrelerinde CFZ ve IXS için benzer olarak üçlü kombinasyonda ikili kombinasyonlara oranla belirgin bir ekspresyon artışı saptandı. Üçlü kombinasyon uygulamalarında CFZ'nin tüm hücre hatlarında en yüksek ekspresyon değerlerine neden olması önemliydi. Çünkü IXS'in üçlü kombinasyonlarında U266 ve NCI H929 hücrelerinde en düşük, RPMI 8226 hücrelerinde en yüksek ekspresyon değerleri bulundu. Bu durum IXS'nin CFZ'ye göre NFκB aktivasyonunu daha etkili inhibisyonu olarak değerlendirildi.

5.2.3.2. *MyD88* Geni İfade Düzeyi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

TLR3 uyarıcı ligand etkileşimini inceleyen Salaun ve ark. (2006), agonistin kanserli hücrelerde sitotoksik ajan olarak doğrudan apoptoz destekleyici kullanımını göstermiştir. Araştırmada, TLR3 sinyal yolundaki apoptozun MyD88'den bağımsız olduğu ve ekspresyonundaki azalmanın etki oluşturmadığı gösterilmiştir. Bulgularımızda MyD88 bağımlı olarak çalışan TLR1/2 sinyal yolunun etkinliğini belirgin şekilde gözlemledik. Deneylerimizde Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında *MyD88* gen ekspresyonu U266 ve RPMI 8226 hücre hatlarında artma, NCI H929 hücre hattında azalma olarak gözlemlendi. Ancak RPMI 8226 hücre hattındaki artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Pam₃CSK₄ ve CFZ'nin ikili kombinasyonu ilginç şekilde 3 hücre hattında da anlamlı artışa neden oldu. Aynı şekilde Üçlü kombinasyonda 3 hücre hattında da yüksek derecelerde anlamlı artış gözlemlendi. Ekspresyondaki söz konusu artışlar TLR sinyal yolunda görevli merkezi adaptör MyD88'in aktif kullanımını göstermesi muhtemeldir. Ayrıca CFZ'nin TLR stimülasyonu ile gelişen NFκB aktivasyonunu daha az baskılaması olarak yorumlanabilir. Nitekim, IXS uygulamalarındaki ekspresyon değerleri CFZ eşleniklerine göre daha düşük bulundu. İkili ve üçlü kombinasyonlarda çıkan değerler büyük oranda istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Sadece RPMI 8226 hücrelerinin üçlü kombinasyonunda belirgin bir artış saptandı. Söz konusu değerler IXS'in NFκB aktivasyonu üzerinde daha etkili inhibisyon oluşturması ve TLR stimülasyonunun ana bileşeni MyD88 ekspresyonunu baskılaması olarak değerlendirildi.

5.2.3.3. *TRAF6* Geni İfade Düzeyi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

MM'da yeni tedavi seçeneklerine yönelik hedefleri inceleyen Liu ve ark. (2012) tümör hücrelerinin büyüme, canlılık, ölümsüzlük ve ilaç dirençliliklerinde hayatta kalmaya aracılık eden sinyal yollarının önemini belirtmiştir. Bunlar arasında; TLR stimülasyonu sonrasında aktifleşen NF κ B aktivasyonunun kanserleşme sürecine katkısından ve sinyal yolu bileşeni *TRAF6* gen ekspresyonunun öneminden bahsetmiştir. Araştırmada doğrudan *TRAF6*'yı hedef alan tedavi stratejilerinin verimli olabileceği öngörülmüştür. Deneylerimizde Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında *TRAF6* gen ekspresyonu U266 hücre hattında azalma, RPMI 8226 ve NCI H929 hücre hatlarında artış olarak gözlemlendi. CFZ ile yapılan ikili kombinasyon, ekspresyonu RPMI 8226 hücrelerinde arttırıcı, NCI H929 hücrelerinde azaltıcı etki gösterdi. CFZ ile yapılan üçlü kombinasyon ise RPMI 8226 ve NCI H929 hücrelerinde belirgin artışa neden oldu. Bu durum CFZ'nin TLR sinyal yolu etkinliğini U266 hücrelerinde etkili bir şekilde baskılaması, RPMI 8226 ve NCI H929 hücrelerinde yetersiz gelmesi olarak değerlendirildi. IXS'te CFZ'ye benzer bir profil gözlenmekle birlikte, ekspresyon değerleri eşleniklerine göre büyük oranda daha düşüktü. Bu durum IXS'in CFZ'ye göre TLR sinyal yolunu daha etkili inhibibisyonu olarak değerlendirildi. U266 hücrelerindeki değerler benzer azalmalar göstermesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Salaun ve ark. (2006) TLR3 sinyal yolu stimülasyonunun kanser hücrelerinde apoptoz destekleyici rolünü incelemiştir. Çalışmalarında TLR3 aracılığıyla NF κ B aktivasyonunda *TRAF6* gen ekspresyonunun önemli rol oynadığı göstermiştir. Bu amaçla deneylerimizde Pam₃CSK₄ stimülasyonu ile aktifleşen TLR1/2 sinyal yoluna bağlı olarak *TRAF6* ekspresyon değişimini değerlendirdik. Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarındaki değişimler istatistiksel olarak önemli bulundu. Ancak *TRAF6* ekspresyonu tekil Pam₃CSK₄ uygulamasında U266 hücrelerinde azalma, RPMI 8226 ve NCI H929 hücrelerinde artma olarak gözlemlendi. CFZ'nin ikili ve üçlü kombinasyonlarında U266 hücrelerinde belirgin bir fark gözlenmedi. RPMI 8226 ve NCI H929 hücrelerinde üçlü kombinasyonda ise en yüksek değerler bulundu. Benzer şekilde IXS uygulamalarında U266 hücreleri için istatistiksel olarak anlamlı olmayan ve azalan ekspresyon değerleri gözlemlendi. RPMI 8226 ve NCI H929 hücrelerinde ise IXS'teki değerler CFZ'deki eşleniklerine göre daha düşük

bulundu. Ancak ilginç şekilde üçlü kombinasyonda sadece RPMI 8226 hücrelerinde anlamlı belirgin bir artma mevcuttu. CFZ ve IXS uygulamalarında gözlenen bu farklılığın NFκB aktivasyonunun farklı derecelerde inhibisyonuna bağlı olarak gelişmesi muhtemeldir. Çünkü *TRAF6* gen ürünü TLR1/2 sinyal yolunda aktif görevlidir (Monlish ve ark., 2016).

5.3. Protein Ekspresyon Verilerinin Değerlendirilmesi

Kemoterapik ajanlar tümör hücreleri üzerinde apoptotik stres oluşturmaktadır (Hungria ve ark., 2019; Punnoose ve ark., 2016). İnhibisyona bağlı hücre ölümünün değerlendirilmesinde ortak efektör olarak görev alan kaspaz 3'ün incelenmesi kullanışlı bir biyo-belirteçtir (Glushakova ve ark., 2017). Bu nedenle deneylerimizdeki Pİ ve anti-apoptotik inhibitöre bağlı gelişen total apoptotik değişimi kaspaz 3'ün inaktif ve aktif formlarıyla değerlendirdik. Diğer taraftan, Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşulları TLR1/2 reseptörlerine sahip hücrelerde FADD ölüm reseptörü aracılığıyla apoptozu tetikleyebilmektedir (Salaun ve ark., 2006). Deney sistemimizde söz konusu stimülasyonla gelişen hücre ölüm sinyal yolunu BH3 etkileşimli ölüm domain agonisti (BH3 interacting domain death agonist, Bid) proteininin inaktif (Bid) ve aktif (tBid) formlarıyla değerlendirdik. Çünkü hücrenin FADD ilişkili hücre apoptozunda Bid aktivasyonu translasyon sonrası aktivasyonun özgün bir örneğidir (Lomonosova ve Chinnadurai, 2008). Ayrıca hücre apoptozunu tetikleyen dışsal ve içsel sinyal yolları, kaspaz-8 aracılığıyla Bid proteini aktifleştirerek ortaklık göstermektedir. tBid, hücrede mitokondriyal dış membran (mitochondrial outer membranes, MOM) geçirgenliğini bozmakta ve CytC salınımını tetikleyerek efektör kaspaz aktivasyonunu ve apoptoza neden olmaktadır (Fang ve Peng, 2022). Bu nedenle deneylerimizdeki Pİ ve anti-apoptotik inhibitörlerin yanı sıra Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşulları bağlı gelişen total apoptotik değişimi Bid'in inaktif ve aktif formlarıyla değerlendirdik.

MM hücrelerinde tekil ve kombine olarak CFZ, IXS ve VNT inhibitör uygulamaları yapılmaktadır. Böylelikle inhibitörlere özgü apoptotik bir profilin oluşması sağlanmaktadır. Söz konusu profilin değerlendirilmesi ortak efektör olan kaspaz 3 protein ekspresyonundaki değişimle incelenmektedir. Buna göre artan apoptotik etkinlikle inaktif

kaspaz 3 proteolitik yıkıma uğrayarak aktif kaspaz 3'e dönüşmektedir. Hücre ölümüyle inaktif kaspaz 3 ekspresyonunda azalma, aktif kaspaz 3 ekspresyonunda artma beklenmektedir.

MM hücrelerinde Pam₃CSK₄ agonisti ile TLR1/2 sinyal yolu aktifleştirilmektedir. Aktifleşen TLR1/2 sinyal yolağının, öncelikli olarak transkripsiyon faktörü NFκB aktivasyonunu tetiklemesi beklenmektedir. TLR1/2 stimülasyonunda Pİ'ler kullanılarak NFκB yönlü ilerleyişinin durdurulması ve sinyal yolağının apoptozu tetikleyen yolağa yönlendirilmesi hedeflenmektedir. Söz konusu yönlendirme Bid protein ekspresyonundaki değişimle incelenmektedir. Buna göre yönlendirme sonrasında artan apoptotik etkinlik ile inaktif Bid proteini proteolitik yıkıma uğrayarak aktif tBid'e dönüşmektedir. Böylelikle Pam₃CSK₄ etkinliğiyle birlikte inaktif Bid ekspresyonunda azalma, aktif tBid ekspresyonunda artma beklenmektedir.

5.3.1. Kaspaz 3 Protein Ekspresyon Verilerinin Değerlendirilmesi

Kaspazlar, programlanmış hücre ölümü ve inflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde görevli proteolitik enzimlerdir. İşlevlerine göre apoptotik ve inflamatuvar olarak iki kategoride sınıflandırılır. Apoptotik kaspazlar programlanmış hücre ölümünde, inflamatuvar kaspazlar proinflamatuvar sitokinler aracılığıyla bağışıklık yanıtı düzenlenmesinde görevlidir (Fang ve Peng, 2022). Apoptotik kaspazlar, hücrede dışsal ve içsel stimülasyonlarla aktifleştirilebilir. Dışsal yolda ölüm reseptörü aracılı, içsel yolda hücre içi stres kaynaklı stimülasyonlar etki gösterir (Lomonosova ve Chinnadurai, 2008). Dışsal yolda, hedef ligandların varlığında ölüm reseptörleri indükleyici sinyal kompleksini oluşturarak kaspaz 8'i aktifleştirir. Buna karşılık kaspaz-8, hücre apoptozisine yol açan efektör kaspaz 3 ve 7'yi aktifleştirir (Fang ve Peng, 2022). İçsel yolda, çeşitli stres sinyalleri BH3 protein ailesi üyelerini aktifleştirerek MOM bütünlüğünü bozar ve CytC salınımına yol açar. Sitozoldeki CytC, apoptozom kompleksinin oluşumunu ve kaspaz 9'u aktifleştirir. Buna karşılık aktif kaspaz 9, apoptozun gerçekleşmesi için efektör kaspaz 3 ve 7'yi aktifleştirir (Picca ve ark., 2021). Ortak efektör kaspazları hem dışsal hem de içsel apoptoz yollarında aktifleştirmektedir (Fang ve Peng, 2022).

Kaspaz 3, apoptozda önemli bir ortak efektör proteazdır. Hücrede DNA ve hücre iskeletinin degradasyonu gibi yıkımları koordine etmedeki rolü nedeniyle apoptozu yürütücü kaspaz olarak bilinir (Van Opdenbosch ve Lamkanfi, 2019). Hücredeki aktivitesi kontrollü olup inaktif formda zimojen olarak üretilir ve stimülasyonla aktive edilir (McIlwain ve ark., 2013). Kaspaz 3'ün ölmekte olan tümör hücrelerinde aktivitesinin arttığı ve dirençliliğe yol açan mekanizmalarla ilişkisi gösterilmiştir (Shalini ve ark., 2015).

MM tedavisinde yeni nesil PI'lerin kombinasyonel kullanımını inceleyen Rosebeck ve ark. (2015) CFZ'nin kullanışlı bir aday olduğunu raporlamıştır. Çalışmalarında MM hücre hattında CFZ uygulamasının apoptoz ilişkili protein analizi yapılmış ve 24 saatlik uygulamada 50 nM konsantrasyonda inaktif kaspaz 3'ün aktif forma dönüşümü gösterilmiştir. Tekil kullanıma göre farklı kombinasyonların aktif kaspaz 3 oranını arttırdığı ifade edilmiştir. Deneylerimizde kaspaz 3'ün inaktif ve aktif ekspresyonlarında farklı sonuçlar elde ettik. U266 hücrelerinde normal kültür koşullarında aktif kaspaz 3'e dönüşüm Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarından daha fazla gözlemlendi. CFZ/VNT kombinasyonunda söz konusu dönüşüm hiç bulunmadı. Pam₃CSK₄ stimülasyonlu koşullarda aktif kaspaz 3 dönüşümünün azalması ve VNT kombinasyonlarında hiç olmaması kullanılan kombinasyonların yetersiz sinerjisini gösterdi. RPMI 8226 hücrelerinde aktif kaspaz 3'e dönüşüm Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında normal kültür koşullarına göre belirgin şekilde gözlemlendi. Normal kültür koşullarında CFZ/VNT kombinasyonunda gözlenen sınırlı dönüşümün, PAM₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında gerek tekil gerekse kombine uygulamalarda arttığı saptandı. Bu durum Pam₃CSK₄ stimülasyonunun RPMI 8226 hücrelerinde inhibitörlerin apoptoz uyarıcı etkisini desteklemesi ve kombinasyonların güçlü sinerji göstermesi olarak değerlendirildi. NCI H929 hücrelerinde aktif kaspaz 3'e dönüşüm normal kültür koşullarında Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarından daha fazla gözlemlendi. Ayrıca normal kültür koşullarındaki dönüşümün CFZ/VNT kombinasyonuna göre tekil uygulamada daha yüksek olduğu gözlemlendi. Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında normal kültür koşullarına göre CFZ uygulamalarında oldukça düşük, IXS uygulamalarında daha az ekspresyon saptandı. Bu sonuçlar NCI H929 hücrelerinde CFZ

ve IXS için VNT kombinasyonlarının ve Pam₃CSK₄ stimölasyonunun olumsuz sinerjisi olarak değerlendirildi.

MM tedavisinde VNT'nin tekil ve kombine kullanımını inceleyen Punnoose ve ark. (2016), Pİ ile kombinasyonun güçlü apoptotik etkisini ve aktif kaspaz 3 ekspresyonunu arttırdığı raporlamıştır. Araştırmada NCI H929 hücrelerinde BTZ'nin tekil kullanımında gözlenen aktif kaspaz 3'ün VNT kombinasyonuna göre daha az olduğu gösterilmiştir. Bulgularımızda NCI H929 hücrelerinde CFZ ve IXS'in VNT uygulamalarında benzer bir profil gözlemlenmedi. Normal kültür koşullarında CFZ ve IXS'in tekil uygulamalarında VNT kombinasyonlarına göre daha yüksek aktif kaspaz 3'ün ekspresyonu bulundu. Pam₃CSK₄ stimölasyonlu kültür koşullarında aktif kaspaz 3'ün ekspresyonu CFZ'nin tekil uygulamasında oldukça düşük miktarda, IXS'in tekil uygulamasında VNT kombinasyonuna göre daha yüksek miktarda saptandı. Böylelikle NCI H929 hücrelerinde CFZ ve IXS'e gerek VNT'nin gerekse Pam₃CSK₄'ün dahil edilmesinin olumlu bir sinerjik etkisi belirlenmedi. Aynı şekilde, U266 hücrelerinde CFZ'nin tekil uygulamasında VNT kombinasyonuna göre belirgin bir aktif kaspaz 3'ün ekspresyonu bulundu. IXS'te ise farklı olarak VNT kombinasyonu olumlu katkı sağladı ve kombinasyonda daha yüksek aktif kaspaz 3 ekspresyonu saptandı. IXS'in Pam₃CSK₄ stimölasyonlu kültür koşullarındaki eşleniklerinde normal kültür koşullarına göre daha düşük olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar U266 hücrelerinde IXS'in CFZ'ye göre daha etkili olduğu, VNT kombinasyonunun olumlu sinerji göstermesi, Pam₃CSK₄ stimölasyonunun olumsuz sinerji göstermesi olarak değerlendirildi. RPMI 8226 hücrelerinde normal kültür koşullarında CFZ ve IXS'in tekil uygulamalarında VNT kombinasyonlarına göre daha düşük aktif kaspaz 3 ekspresyonu gözlemlendi. Pam₃CSK₄ stimölasyonlu kültür koşullarında aktif kaspaz 3'ün ekspresyonu çok daha güçlü şekilde ve tüm uygulamalarda saptandı. Bu sonuçlar RPMI 8226 hücreleri için CFZ ve IXS'in VNT kombinasyonlarının ve de Pam₃CSK₄ stimölasyonunun olumlu sinerjik etkisi olarak değerlendirildi.

MM'de alternatif tedavi için TLR stimölasyonunun etkisini inceleyen Abdi ve ark. (2013) TLR1/2 ligandı Pam₃CSK₄ ile Pİ inhibitörünün sitotoksik gücünün artırma potansiyelini raporlamıştır. Çalışmalarında U266 hücrelerinde TLR1/2 ligandı ve BTZ kombinasyonunda inaktif kaspaz 3'ün aktif forma dönüşümünün daha yüksek olduğu

gösterilmiştir. Deneylerimizde U266 hücreleri için bu sonuçlarla uyumlu olmayan veriler elde ettik. U266 hücrelerindeki inaktif kaspaz 3'ün aktif forma dönüşümünde, Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında normal kültür koşullarına göre daha düşük ekspresyon gözlemlendi. Uygulamalara VNT'nin dahil edilmesi CFZ'de olumsuz, IXS'te olumlu bir etki oluşturdu. Ancak VNT kombinasyonları, normal ve Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşulları açısından karşılaştırıldığında inaktif kaspaz 3'ün aktif forma dönüşümünde benzer düşük ekspresyon gözlemlendi. Bu sonuçlar Pam₃CSK₄ stimülasyonunun hücre canlılığına sağladığı katkının Pİ'leri olumsuz etkilemesi olarak değerlendirildi. Nitekim uygulamalara VNT'nin dahil edilmesi IXS'te CFZ'ye göre olumlu etki oluşturmaya rağmen Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında aktif kaspaz 3'ün ekspresyonunda azalma gözlemlendi. RPMI 8226 hücreleri için Abdi ve ark. (2013) sonuçlarıyla uyumlu veriler elde ettik. Normal kültür koşullarında CFZ ve IXS'in tekil uygulamalarında aktif kaspaz 3 için belirgin bir ekspresyon gözlenmemesine rağmen VNT kombinasyonlarında sınırlı oranda artış gözlemlendi. Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında ise tüm uygulamalarda belirgin bir artış saptandı. Bu sonuçlar RPMI 8226 hücrelerinde gerek VNT'nin gerekse Pam₃CSK₄ stimülasyonunun olumlu sinerjik etkisi olarak değerlendirildi. NCI H929 hücrelerinde Abdi ve ark. (2013) sonuçlarıyla uyumlu olmayan veriler elde ettik. Buna göre Pam₃CSK₄ stimülasyonunun normal kültür koşullarındaki eşlenikleriyle yapılan karşılaştırmasında aktif kaspaz 3 açısından bir artış saptanmadı. İlginç şekilde Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kontrol hücrelerinin aktif kaspaz 3 ekspresyonu normal kültür koşullarından fazla olduğu belirlendi. Bu durum hücreler üzerinde sınırlı oranda da olsa apoptozu destekleyici etkisi olarak değerlendirildi.

5.3.2. Bid Protein Ekspresyon Verilerinin Değerlendirilmesi

Bid proteini, hücrede apoptozu yönlendiren BCL2 ailesi üyelerindendir. Sağlıklı hücrelerde sitozolde inaktif konformasyonda, ölüm sinyali alan hücrelerde aktif konformasyonda mitokondride bulunmaktadır (Wei ve ark., 2000).

Bid proteini hücrede çeşitli ölüm reseptörlerinden gelen apoptotik sinyali mitokondriye iletmektedir. Sürecin ilk aşamasında ölüm reseptörleri hedef ligandların varlığında FADD aracılığıyla kaspaz 8'i aktive etmektedir. Aktif kaspaz 8, 22 kDa'luk inaktif Bid

proteinini 15 kDa'luk aktif forma (tBid) dönüştürmektedir (Tait ve ark., 2007). tBid hücrede mitokondriyi hedef almakta ve mitokondriyal yolla ölüm reseptörünün neden olduğu hücre ölümüne aracılık etmektedir (Lomonosova ve Chinnadurai, 2008). Daha sonrasında APAF 1>Kaspaz 9 kompleksinin oluşumuna ve devamında efektör kaspaz 3 ve 7'nin aktifleştirilmesiyle içsel hücre apoptozunun tetiklenmesine aracılık etmektedir (Wei ve ark., 2000).

Aliparantis ve ark. (2000) NFκB aktivasyon inhibisyonunun, TLR1/2'in FADD üzerinden ölüm reseptörü olarak etkinliğini raporlamıştır. Bu amaç doğrultusunda çalışmamızda Pam₃CSK₄ stimülasyonu ile TLR1/2 sinyal yolunu aktifleştirmeyi, NFκB aktivasyonunu inhibe edici Pİ'ler aracılığıyla da TLR sinyal yolunu apoptoza modüle etmeyi hedefledik. Böylelikle Pİ'lerin kemoterapik etkinliği ve Pam₃CSK₄ stimülasyonunun hücre apoptozunda sinerjik etki oluşturmalarını amaçladık. Söz konusu etkileşimi FADD ölüm sinyalinin önemli araçlardan birisi olan Bid > tBid dönüşümüyle değerlendirdik.

B lenfositlerinde ölüm reseptörlerinin hücresel sinyalizasyonu inceleyen Lemmers ve ark. (2007) TLR 2, 3 ve 4'ün etkinliğini raporlamıştır. Çalışmalarında ligandla uyarılan hücrelerde gelişen sinyal yolunun kaspaz 8 aracılığıyla yönetildiği ve apoptozdaki etkilerini göstermiştir. Bu süreçte apoptoz destekleyici rolün NFκB aktivasyonunun baskılanması, kaspaz 8'in doğrudan kaspaz 3'ü aktifleştirmesi veya Bid'in işlenerek tBid'e dönüşümüyle geliştiği ifade edilmiştir. Deneylerimizde NFκB aktivasyonunun TLR aracılığıyla sağlayan Pam₃CSK₄ stimülasyonunun ve inhibe eden Pİ'lerin etkilerini Bid'in değişen inaktif ve aktif formlarında gözlemledik. Buna göre U266 hücrelerinin normal kültür koşullarında CFZ'nin tekil uygulamasında hem Bid hem de tBid ekspresyonu gözlemlendi. CFZ/VNT kombinasyonunda oldukça düşük bir ekspresyon mevcuttu. tBid'e dönüşümde IXS'in gerek tekil gerekse VNT kombinasyonunda ekspresyonlar mevcuttu ve ikili kombinasyonda daha yüksek bulundu. Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında normal kültür koşullarına benzer bir profil oluşmakla birlikte ekspresyonların eşleniklerine göre daha düşük olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar Pam₃CSK₄ stimülasyonunun U266 hücrelerinde FADD ilişkili dışsal uyarımlı apoptozda görev almaması olarak değerlendirildi. İlginç şekilde normal ve Pam₃CSK₄ stimülasyonlu

kültür koşullarında IXS'in tekil ve VNT kombinasyonlarında güçlü bir aktif Bid dönüşümü mevcuttu. Bu durum IXS uygulamalarının U266 hücrelerinde apoptozu CFZ'ye göre daha etkili tetiklemesi olarak değerlendirildi. RPMI 8226 hücrelerinde normal kültür koşullarında Bid'lerin tBid'e dönüşümünde belirgin bir ekspresyon gözlenmedi. Bunlardan CFZ'nin tekil uygulamasında ve IXS/VNT kombinasyonunda tBid için diğerlerine oranla sınırlı miktarda ekspresyon artışı mevcuttu. Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında CFZ/VNT kombinasyonunda ve IXS'in tekil uygulamasında Bid ekspresyonunda artış saptandı. tBid açısından CFZ/VNT kombinasyonunda sınırlı bir ekspresyon gözlemlendi. Pam₃CSK₄ stimülasyonlu ve normal kültür koşulları karşılaştırıldığında, tBid dönüşüm açısından belirgin bir fark gözlenmedi. Bu sonuçlar RPMI 8226 hücrelerinde ikili ve üçlü kombinasyonların FADD ilişkili dışsal uyarımlı apoptozu teşvik etmemesi olarak değerlendirildi. NCI H929 hücrelerinde normal kültür koşullarında CFZ'nin tekil ve VNT kombinasyonlu uygulamalarında oldukça benzer bir Bid ekspresyonu bulundu. tBid'e dönüşüm CFZ'nin tekil uygulamasında daha yüksekti. IXS'in tekil uygulamasında VNT kombinasyonuna göre belirgin bir ekspresyon farkı saptandı. Bid'in tBid'e dönüşümü tekil IXS uygulamasında oldukça güçlü bir ekspresyonla gözlemlendi. Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında CFZ'nin tekil ve VNT kombinasyonlu uygulamalarında Bid ve tBid için oldukça düşük bir ekspresyon saptandı. Ancak IXS'in tekil ve VNT kombinasyonunda belirgin bir ekspresyon gözlemlendi. Buna göre Pam₃CSK₄ stimülasyonlu IXS tekil uygulamasında normal kültürdeki eşleniğine göre daha düşük bir ekspresyon gözlemlendi. İlginç şekilde normal kültürde sınırlı ekspresyon gözlenen IXS/VNT kombinasyonunda, Pam₃CSK₄ stimülasyonlu üçlü kombinasyonda Bid ve tBid açısından oldukça güçlü bir ekspresyon belirlendi. NCI H929 hücrelerindeki bu sonuçlar CFZ'nin gerek tekil gerekse VNT kombinasyonunun normal ve Pam₃CSK₄ stimülasyonlu kültür koşullarında Bid dönüşümü açısından özgün bir etki oluşturmaması olarak değerlendirildi. Diğer taraftan normal kültür koşullarında IXS'in tekil uygulamasında gözlenen yüksek tBid ekspresyonunun, Pam₃CSK₄ stimülasyonlu koşullarda hem tekil hemde VNT kombinasyonunda gözlenmesi olumlu sinerji olarak değerlendirildi.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Literatür çalışmalarında TLR sinyalizasyonunun çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanımı yoğun bir araştırma konusu olup başarılı örnekleri kliniğe girmiştir. MM açısından yakın dönemde yapılan çalışmalarda çelişkiler mevcuttur. Bunlardan TLR sinyalizasyonunun MM hücrelerinde büyüme, proliferasyon ve ilaç dirençliliğine katkılarını belirtenlerin yanısıra doğrudan apoptozu ve ilaç etkinliğini güçlendirici etkilerini gösteren değerlendirmeler bulunmaktadır.

Tez çalışmamızda, yeni nesil Pİ'lerin apoptotik protein inhibitörleri ve TLR sinyal yolunu uyarıcı ligandlarla kombinasyonunu inceledik. Bulgularımız MM hücrelerinde Pİ'ler aracılığıyla oluşturulan stresin gerek apoptotik protein inhibitörleri gerekse TLR sinyal yolunu uyarıcı ligandlarla modülasyon potansiyelini gösterdi. Nitekim yakın dönemde TLR1/2 aktivasyonu ile hücre adezyonunun modülasyonu ve Pİ ajanı kombinasyonu sayesinde ilaç dirençliliğinin azaldığı raporlanmıştır. Ancak bulgularımızda bu verilere zıt şekilde, TLR1/2 aktivasyonunun MM hücrelerinde büyüme, proliferasyon ve ilaç dirençliliğine katkısını gözlemledik. Ayrıca söz konusu yanıtlarda yeni nesil inhibitörlere özgü bir profil oluştuğunu ve TLR sinyal bileşenlerinin ekspresyonlarındaki değişkenliğini raporladık. Böylelikle TLR1/2 aktivasyonu ile aktifleşen NFκB aktivasyonunu MM patofizyolojisi açısından değerlendirdik. Bu veriler, TLR sinyal yolunun moleküler mekanizması hakkında yeni bilgiler sağlayabilir. Diğer taraftan araştırmamızda literatürde ilk defa apoptotik protein inhibitörlerinin, TLR agonisti ve Pİ üçlü kombinasyonundaki etkisi değerlendirildi. Söz konusu kombinasyon sayesinde MM hücrelerinde TLR ve Pİ uygulamalarından farklı özgün yanıtlar elde edildi.

Sonuç olarak bulgularımız kemoterapötik ajanların sitotoksik etkinin modülasyonunda gerek TLR stimülasyonu gerekse apoptotik protein inhibitörlerinin daha fazla araştırmasını önermektedir. Bu noktada TLR sinyalizasyonunun apoptotik potansiyelinin artırılmasında TRAF6 ve IRAK4 gibi NFκB'yi aktifleştiren diğer adaptörlerin inhibisyonu seçenek olabilir. Ayrıca Pİ ve TLR destekli apoptotik strese yeni nesil apoptotik protein inhibitörlerinin incelenmesi etkili yanıtlara aracılık edebilir. Diğer

tarafından, MM'in heterojenliği düşünöldüğünde çalışmamızın hücre hatlarıyla yapılmış olması ve primer MM verilerinin eksikliği klinik öncesi daha fazla çalışma gerektirmektedir. Gelecekte, genomik ve proteomik teknolojilerle MM patofizyolojik mekanizmaların daha ayrıntılı değeriendirmesi mümkün olacaktır. Böylelikle kontrollü terapiye ve dirençliliğin giderilmesine katkı sağlayan TLR sinyal yolları, apoptotik protein inhibitörleri gibi seçeneklerin etkinliği daha iyi anlaşılacaktır.



KAYNAKLAR

1. Abdi J, Mutis T, Garssen J, Redegeld F. Stimulation of Toll-like receptor-1/2 combined with Velcade increases cytotoxicity to human multiple myeloma cells. *Blood Cancer Journal*, 2013; 3:5-16. <https://doi.org/10.1038/bcj.2013.17>
2. Abdi J, Mutis T, Garssen J, Redegeld FA. Toll-Like Receptor (TLR)-1/2 Triggering of Multiple Myeloma Cells Modulates Their Adhesion to Bone Marrow Stromal Cells and Enhances Bortezomib-Induced Apoptosis. *PLoS ONE*, 2014; 9:5-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096608>
3. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling. *Nature Reviews Immunology*, 2004;4(7):499-511. <https://doi.org/10.1038/nri1391>
4. Algarín EM, Díaz-Tejedor A, Mogollón P, Hernández-García S, Corchete LA, San-Segundo L, Martín-Sánchez M, González-Méndez L, Schoumacher M, Banquet S, Kraus-Berthier L, Kloos I, Derreal A, Halilovic E, Maacke H, Gutiérrez NC, Mateos MV, Paíno T, Garayoa M, Ocio EM. Preclinical evaluation of the simultaneous inhibition of MCL-1 and BCL-2 with the combination of S63845 and venetoclax in multiple myeloma. *Haematologica*, 2020;105(3), 116–120. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.212308>
5. Aliprantis AO, Yang RB, Weiss DS, Godowski P, Zychlinsky A. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *The EMBO Journal*, 2000;19(13):3325-3336. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.13.3325>
6. Anwer F, Gee KM, Iftikhar A, Baig M, Russ AD, Saeed S, Zar MA, Razzaq F, Carew J, Nawrocki S, Al-Kateb H, Parr NN, McBride A, Valent J, Samaras C. Future of Personalized Therapy Targeting Aberrant Signaling Pathways in Multiple Myeloma. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 2019; 19(7):397–405. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2019.03.017>
7. Astakhova T, Morozov A, Erokhov P, Mikhailovskaya M, Akopov S, Chupikova N, Safarov R, Sharova N. Combined Effect of Bortezomib and Menadione Sodium Bisulfite on Proteasomes of Tumor Cells: The Dramatic Decrease of Bortezomib Toxicity in a Preclinical Trial. *Cancers*, 2018; 10(10):351-359. <https://doi.org/10.3390/cancers10100351>
8. Azab AK, Muz B, Ghazarian R, Ou M, Luderer M, Kusdono H. Spotlight on ixazomib: Potential in the treatment of multiple myeloma'. *Drug Design, Development and Therapy*, 2016; 217-224. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S93602>
9. Bagratuni T, Sklirou AD, Kastitis E, Liacos CI, Spilioti C, Eleutherakis-Papaiakevou E, Kanellias N, Gavriatopoulou M, Terpos E, Trougakos IP, Dimopoulos MA. Toll-Like Receptor 4 Activation Promotes Multiple Myeloma Cell Growth and Survival Via Suppression of The Endoplasmic Reticulum Stress Factor Chop. *Scientific Reports*, 2019; 9(1):3245-3250. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39672-7>
10. Besse A, Besse L, Kraus M, Mendez-Lopez M, Bader J, Xin BT, de Bruin G, Maurits E, Overkleeft HS, Driessen C. Proteasome Inhibition in Multiple Myeloma: Head-to-Head Comparison of Currently Available Proteasome Inhibitors. *Cell Chemical Biology*, 2019; 26(3):340-351. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.11.007>

11. Bohnhorst J, Rasmussen T, Moen SH, Fløttum M, Knudsen L, Børset M, Espevik T, Sundan A. Toll-like receptors mediate proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia*, 2006;20(6):1138–1144. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404225>
12. Bordini J, Morisi F, Cerruti F, Cascio P, Camaschella C, Ghia P, Campanella A. Iron Causes Lipid Oxidation and Inhibits Proteasome Function in Multiple Myeloma Cells: A Proof of Concept for Novel Combination Therapies. *Cancers*, 2020;12(4):970-979. <https://doi.org/10.3390/cancers12040970>
13. Brenner AK, Bruserud Ø. Functional Toll-Like Receptors (TLRs) Are Expressed by a Majority of Primary Human Acute Myeloid Leukemia Cells and Inducibility of the TLR Signaling Pathway Is Associated with a More Favorable Phenotype. *Cancers*, 2019;11(7):973-993. <https://doi.org/10.3390/cancers11070973>
14. Brodsky I, Medzhitov R. Two Modes of Ligand Recognition by TLRs. *Cell*, 2007;130(6):979-982. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.009>
15. Caplan IF, Maguire-Zeiss KA. Toll-Like Receptor 2 Signaling and Current Approaches for Therapeutic Modulation in Synucleinopathies. *Frontiers in Pharmacology*, 2018;9:417-422. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00417>
16. Chan M, Ji SM, Liaw CS, Yap YS, Law HY, Yoon CS, Wong CY, Yong WS, Wong NS, Ng R, Ong KW, Madhukumar P, Oey CL, Tan PH, Li HH, Ang P, Ho GH, Lee ASG. Association of common genetic variants with breast cancer risk and clinicopathological characteristics in a Chinese population. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2012; 136(1):209–220. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2234-y>
17. Chauhan D, Tian Z, Zhou B, Kuhn D, Orlowski R, Raje N, Richardson P, Anderson KC. *In Vitro* and *In Vivo* Selective Antitumor Activity of a Novel Orally Bioavailable Proteasome Inhibitor MLN9708 against Multiple Myeloma Cells. *Clinical Cancer Research*, 2011; 17(16):5311–5321. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0476>
18. Chen H, Li M, Sanchez E, Wang CS, Lee T, Soof CM, Casas CE, Cao J, Xie C, Udd KA, DeCorso K, Tang GY, Spektor TM, Berenson JR. Combined TRAF6 Targeting and Proteasome Blockade Has Anti-myeloma and Anti-Bone Resorptive Effects. *Molecular Cancer Research*, 2017; 15(5):598–609. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0293>
19. Chen J, Garssen J, Redegeld F. The efficacy of bortezomib in human multiple myeloma cells is enhanced by combination with omega-3 fatty acids DHA and EPA: Timing is essential. *Clinical Nutrition*, 2021; 40(4):1942–1953. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.09.009>
20. Chen Q, Hou T, Luo F, Wu X, Xie Z, Xu J. Involvement of Toll-Like Receptor 2 and Pro-Apoptotic Signaling Pathways in Bone Remodeling in Osteomyelitis'. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2014; 34(6):1890-1900. <https://doi.org/10.1159/000366387>
21. Chiron D, Bekeredjian-Ding I, Pellat-Deceunynck C, Bataille R, Jego G. Toll-like receptors: Lessons to learn from normal and malignant human B cells. *Blood*, 2008; 112(6): 2205-2213. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-140673>
22. Chiron D, Pellat-Deceunynck C, Amiot M, Bataille R, Jego G. TLR3 Ligand Induces NF-κB Activation and Various Fates of Multiple Myeloma Cells

- Depending on IFN- α Production. *The Journal of Immunology*, 2009; 182(7):4471–4478. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803113>
23. Cho HY, Lee SW. TLR5 activation by flagellin induces doxorubicin resistance via interleukin-6 (IL-6) expression in two multiple myeloma cells. *Cellular Immunology*, 2014; 289(1–2): 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.03.003>
 24. Croce CM, Reed JC. Finally, An Apoptosis-Targeting Therapeutic for Cancer'. *Cancer Research*, 2016; 76(20):5914–5922. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1248>
 25. Croonquist PA, Linden MA, Zhao F, Van Ness BG. Gene profiling of a myeloma cell line reveals similarities and unique signatures among IL-6 response, N-ras-activating mutations, and coculture with bone marrow stromal cells'. *Blood*, 2003;102(7):2581–2593. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1227>
 26. Demchenko YN, Kuehl WM. A critical role for the NF κ B pathway in multiple myeloma'. *Oncotarget*, 2010; 1(1):59–68. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.109>
 27. Dietrich N, Lienenklaus S, Weiss S, Gekara NO. (). 'Murine Toll-Like Receptor 2 Activation Induces Type I Interferon Responses from Endolysosomal Compartments'. *PLoS ONE*, 2010; 5(4):1025–1035. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010250>
 28. Dimopoulos MA, Facon T, Terpos E. Multiple myeloma and other plasma cell neoplasms. Springer, 2018:8–17.
 29. Donk NWCJ, Lokhorst HM, Bloem A.C. Growth factors and antiapoptotic signaling pathways in multiple myeloma'. *Leukemia*, 2005; 19(12):2177–2185. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403970>
 30. Dou Q, Zonder J. Overview of Proteasome Inhibitor-Based Anti-cancer Therapies: Perspective on Bortezomib and Second Generation Proteasome Inhibitors versus Future Generation Inhibitors of Ubiquitin-Proteasome System'. *Current Cancer Drug Targets*, 2014; 14(6):517–536. <https://doi.org/10.2174/1568009614666140804154511>
 31. Du B, Jiang QL, Cleveland J, Liu BR, Zhang D. Targeting Toll-like receptors against cancer'. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, 2016; 2(12): 463–70. <https://doi.org/10.20517/2394-4722.2016.62>
 32. El-Zayat SR, Sibaii H, Mannaa FA. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: An overview'. *Bulletin of the National Research Centre*, 2019; 43(1). <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0227-2>
 33. Ercetin AP, Ozcan MA, Aktas S, Yuksel F, Solmaz SM, Sevindik GO, Katgi A, Piskin O, Undar B. *Ex vivo* evaluation of the effect of regulatory T cells on the anti-tumor activity of bortezomib in multiple myeloma'. *Experimental Hematology*, 2016; 44(4):223–230. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2015.05.019>
 34. Eriksson M, Peña-Martínez P, Ramakrishnan R, Chapellier M, Högberg C, Glowacki G, Orsmark-Pietras C, Velasco-Hernández T, Lazarević VL, Juliusson G, Cammenga J, Mulloy JC, Richter J, Fioretos T, Ebert BL, Järås M. Agonistic targeting of TLR1/TLR2 induces p38 MAPK-dependent apoptosis and NF κ B-

- dependent differentiation of AML cells'. *Blood Advances*, 2017;1(23). <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017006148>
35. Fang Y, Peng K. Regulation of innate immune responses by cell death-associated caspases during virus infection'. *The FEBS Journal*, 2022; 289(14):4098–4111. <https://doi.org/10.1111/febs.16051>
 36. Fernando RC, Carvalho F, Mazzotti DR, Evangelista AF, Tobias Braga, WM, Chauffaille ML, Paes Leme AF, Colleoni GWB. Multiple myeloma cell lines and primary tumors proteome: Protein biosynthesis and Immune system as potential therapeutic targets'. *Genes & Cancer*, 2015; 6(11–12). <https://doi.org/10.18632/genesandcancer.88>
 37. Gandolfi S, Laubach JP, Hideshima T, Chauhan D, Anderson KC, Richardson PG. The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma'. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2017; 36(4):561–584. <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9707-8>
 38. Gao W, Xiong Y, Li Q, Yang H. Inhibition of Toll-Like Receptor Signaling as a Promising Therapy for Inflammatory Diseases: A Journey from Molecular to Nano Therapeutics'. *Frontiers in Physiology*, 2017, 8:508-515. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00508>
 39. Gertz MA, Rajkumar SV. Multiple myeloma: Diagnosis and treatment. Springer, 2014:138-166.
 40. Glushakova O, Glushakov A, Wijesinghe D, Valadka A, Hayes R, Glushakov A. Prospective clinical biomarkers of caspase-mediated apoptosis associated with neuronal and neurovascular damage following stroke and other severe brain injuries: Implications for chronic neurodegeneration'. *Brain Circulation*, 2017;3(2), 87. https://doi.org/10.4103/bc.bc_27_16
 41. Goldstein M, Hoxie J, Zembryki D, Matthews D, Levinson AI. Phenotypic and functional analysis of B cell lines from patients with multiple myeloma'. *Blood*, 1985; 66(2).
 42. Gomez-Bougie P, Maiga S, Tessoulin B, Bourcier J, Bonnet A, Rodriguez MS, Le Gouill S, Touzeau C, Moreau P, Pellat-Deceunynck C, Amiot M. BH3-mimetic toolkit guides the respective use of BCL2 and MCL1 BH3-mimetics in myeloma treatment'. *Blood*, 2018; 132(25):2656–2669. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-03-836718>
 43. Gong JN, Khong T, Segal D, Yao Y, Riffkin CD, Garnier JM, Khaw SL, Lessene G, Spencer A, Herold MJ, Roberts AW, Huang DCS. Hierarchy for targeting prosurvival BCL2 family proteins in multiple myeloma: Pivotal role of MCL1'. *Blood*, 2016; 128(14):1834–1844. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-704908>
 44. Gooding RP, Bybee A, Cooke F, Little A, Marsh SGE, Coelho E, Gupta D, Samson D, Apperley JF. Phenotypic and molecular analysis of six human cell lines derived from patients with plasma cell dyscrasia: Characterization of Myeloma Cell Lines'. *British Journal of Haematology*, 1999; 106(3). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1999.01602.x>
 45. John PG, Daniel AA, Bertil G, Alan F, Robert T, George M, John F. *Wintrobe's clinical hematology* (Thirteenth edition). Wolters Kluwer, Lippincott Williams, Wilkins Health. 2014:4679-4811.

46. John PG, Daniel AA, Bertil G, Alan F, Robert T, George M, John F. *Wintrobe's Clinical Hematology* (Fourteenth edition). Wolters Kluwer, Lippincott Williams, Wilkins Health. 2018:6409-6569.
47. Gulla A, Anderson KC. Multiple myeloma: The (r)evolution of current therapy and a glance into future'. *Haematologica*, 2020;105(10). <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.247015>
48. Harsini S, Beigy M, Akhavan-Sabbagh M, Rezaei N. Toll-like receptors in lymphoid malignancies: Double-edged sword'. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2014; 89(2).<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.08.010>
49. Hideshima, T, Ikeda H, Chauhan D, Okawa Y, Raje N, Podar K, Mitsiades C, Munshi NC, Richardson PG, Carrasco RD, Anderson KC. Bortezomib induces canonical nuclear factor- κ B activation in multiple myeloma cells'. *Blood*, 2009;114(5):1046–1052. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-199604>
50. Ronald H, Edward JB, Leslie ES, Helen EH, Jeffrey IW, John A. *Hematology: Basic principles and practice* (6th edition). Elsevier. 2013:1497-1535.
51. Ronald H, Edward JB, Leslie ES, Helen EH, Jeffrey IW, John A. *Hematology: Basic principles and practice* (7th edition). Elsevier. 2018:1554-1593.
52. Huang KH, Fang WL, Li AFY, Liang PH, Wu CW, Shyr YM, Yang MH. Caspase-3, a key apoptotic protein, as a prognostic marker in gastric cancer after curative surgery'. *International Journal of Surgery*, 2018; 52:258–263. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2018.02.055>
53. Hungria VTM, Crusoé EQ, Bittencourt RI, Maiolino A, Magalhães RJP, Sobrinho JN, Pinto JV, Fortes RC, Moreira ES, Tanaka PY. New proteasome inhibitors in the treatment of multiple myeloma'. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, 2019; 41(1). <https://doi.org/10.1016/j.htct.2018.07.003>
54. Isaza-Correa JM, Liang Z, Berg A, Diepstra A, Visser L. Toll-like receptors in the pathogenesis of human B cell malignancies'. *Journal of Hematology & Oncology*, 2014; 7(1). <https://doi.org/10.1186/s13045-014-0057-5>
55. Ito S. Proteasome Inhibitors for the Treatment of Multiple Myeloma'. *Cancers*, 2020; 12(2). <https://doi.org/10.3390/cancers12020265>
56. Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik SG, Lee H, Lee JO. Crystal Structure of the TLR1-TLR2 Heterodimer Induced by Binding of a Tri-Acylated Lipopeptide'. *Cell*, 2007; 130(6):1071–1082.<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.008>
57. Juarez, E, Nuñez C, Sada E, Ellner JJ, Schwander SK, Torres M. Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes'. *Respiratory Research*, 2010; 11(1). <https://doi.org/10.1186/1465-9921-11-2>
58. Kaiser WJ, Offermann MK. Apoptosis Induced by the Toll-Like Receptor Adaptor TRIF Is Dependent on Its Receptor Interacting Protein Homotypic Interaction Motif'. *The Journal of Immunology*, 2005; 174(8). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.8.4942>
59. Kang JY, Nan X, Jin MS, Youn SJ, Ryu YH, Mah S, Han SH, Lee H, Paik SG, Lee JO. Recognition of Lipopeptide Patterns by Toll-like Receptor 2-Toll-like

- Receptor 6 Heterodimer'. *Immunity*, 2009; 31(6). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.018>
60. Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists'. *Nature Medicine*, 2007; 13(5). <https://doi.org/10.1038/nm1589>
 61. Kato S, Nakashima K, Nagasawa T, Abiko Y, Furuichi Y. Involvement of Toll-like receptor 2 in apoptosis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-infected THP-1 cells'. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2013; 46(3). <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2012.02.003>
 62. Kawai T, Akira S. TLR signaling'. *Seminars in Immunology*, 2007; 19(1). <https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.12.004>
 63. Khan AA, Khan Z, Warnakulasuriya S. Cancer-associated toll-like receptor modulation and insinuation in infection susceptibility: Association or coincidence?' *Annals of Oncology*, 2016; 27(6). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw053>
 64. Kikuchi J, Kuroda Y, Koyama D, Osada N, Izumi T, Yasui H, Kawase T, Ichinohe T, Furukawa Y. Myeloma Cells Are Activated in Bone Marrow Microenvironment by the CD180/MD-1 Complex, Which Senses Lipopolysaccharide'. *Cancer Research*, 2018; 78(7):1766–1778. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2446>
 65. Killeen SD, Wang JH, Andrews EJ, Redmond HP. Exploitation of the Toll-like receptor system in cancer: A doubled-edged sword?' *British Journal of Cancer*, 2006; 95(3). <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603275>
 66. Kim WY, Lee JW, Choi JJ, Choi CH, Kim TJ, Kim BG, Song SY, Bae DS. Increased expression of Toll-like receptor 5 during progression of cervical neoplasia'. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 2008; 18(2):300–305. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2007.01008.x>
 67. Kozanoglu I, Yandim MK, Cincin ZB, Ozdogu H, Cakmakoglu B, Baran Y. New indication for therapeutic potential of an old well-known drug (propranolol) for multiple myeloma'. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2013; 139(2):327–335. <https://doi.org/10.1007/s00432-012-1331-y>
 68. Kuhn DJ, Chen Q, Voorhees PM, Strader JS, Shenk KD, Sun CM, Demo SD, Bennett MK, Leeuwen FWB, Chanan-Khan AA, Orlowski RZ. Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma'. *Blood*, 2007; 110(9):3281–3290. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-065888>
 69. Lee SH, Park SR. Toll-like Receptor 1/2 Agonist Pam3CSK4 Suppresses Lipopolysaccharide-driven IgG1 Production while Enhancing IgG2a Production by B Cells'. *Immune Network*, 2018; 18(1):10-18. <https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e10>
 70. Lee SK, Chwee JY, Ma CAP, Bert N, Huang CW, Gasser S. Synergistic Anticancer Effects of Pam3CSK4 and Ara-C on B-Cell Lymphoma Cells'. *Clinical Cancer Research*, 2014; 20(13):3485–3495. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2522>
 71. Lemmers B, Salmena L, Bidère N, Su H, Matysiak-Zablocki E, Murakami K, Ohashi PS, Jurisicova A, Lenardo M, Hakem R, Hakem A. Essential Role for

- Caspase-8 in Toll-like Receptors and NFκB Signaling'. *Journal of Biological Chemistry*, 2007; 282(10):7416–7423. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606721200>
72. Li C, Chen S, Yue P, Deng X, Lonial S, Khuri FR, Sun SY. Proteasome Inhibitor PS-341 (Bortezomib) Induces Calpain-dependent IκBα Degradation'. *Journal of Biological Chemistry*, 2010; 285(21):16096–16104. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.072694>
 73. Lim KH, Staudt LM. Toll-Like Receptor Signaling'. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2013;5(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011247>
 74. Liu H, Tamashiro S, Baritaki S, Penichet M, Yu Y, Chen H, Berenson J, Bonavida B. TRAF6 Activation in Multiple Myeloma: A Potential Therapeutic Target'. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 2012; 12(3):155–163. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2012.01.006>
 75. Lomonosova E, Chinnadurai G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: An overview'. *Oncogene*, 2008; 27(1):2–19. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.39>
 76. Anthony SF, Dennis LK, Dan LL, Eugene B, Stephen LH, Larry J, Joseph L. *Harrison's hematology and oncology*. McGraw-Hill. 2010:205-217.
 77. López M, Sly LM, Luu Y, Young D, Cooper H, Reiner NE. The 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* Protein Induces Macrophage Apoptosis Through Toll-Like Receptor-2'. *The Journal of Immunology*, 2003; 170(5). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.5.2409>
 78. Ludwig H, Fritz E. Interferon in Multiple Myeloma—Summary of Treatment Results and Clinical Implications'. *Acta Oncologica*, 2000; 39(7). <https://doi.org/10.1080/028418600750063569>
 79. Manavalan B, Basith S, Choi S. Similar Structures but Different Roles – An Updated Perspective on TLR Structures'. *Frontiers in Physiology*, 2011; 2. <https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00041>
 80. Martens UM. *Small Molecules in Hematology* (3rd edition). Springer. 2018:215-243. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-91439-8>
 81. Martínez I, Oliveros JC, Cuesta I, Barrera J, Ausina V, Casals C, Lorenzo A, García E, García-Fojeda B, Garmendia J, González-Nicolau M, Lacoma A, Menéndez M, Moranta D, Nieto A, Ortín J, Pérez-González A, Prat C, Ramos-Sevillano E, Melero JA. Apoptosis, Toll-like, RIG-I-like and NOD-like Receptors Are Pathways Jointly Induced by Diverse Respiratory Bacterial and Viral Pathogens'. *Frontiers in Microbiology*, 2017; 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00276>
 82. Masters JRW, Palsson B. *Cancer cell lines* (Vol. 1–4). Kluwer Academic Publishers. 1999:86-161.
 83. Matsuoka Y, Moore GE, Yagi Y, Pressman D. Production of Free Light Chains of Immunoglobulin by a Hematopoietic Cell Line Derived from a Patient with Multiple Myeloma'. *Experimental Biology and Medicine*, 1967;125(4). <https://doi.org/10.3181/00379727-125-32327>
 84. Matulis SM, Gupta VA, Nooka AK, Hollen HV, Kaufman JL, Lonial S, Boise LH. Dexamethasone treatment promotes Bcl-2 dependence in multiple myeloma resulting in sensitivity to venetoclax'. *Leukemia*, 2016; 30(5). <https://doi.org/10.1038/leu.2015.350>

85. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase Functions in Cell Death and Disease'. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2013; 5(4):8656–8662. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>
86. Mihalyova J, Jelinek T, Growkova K, Hrdinka M, Simicek M, Hajek R. Venetoclax: A new wave in hematocology'. *Experimental Hematology*, 2018; 61:10–25. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2018.02.002>
87. Mitra AK, Kumar H, Ramakrishnan V, Chen L, Baughn L, Kumar S, Rajkumar SV, Van Ness BG. In vitro and ex vivo gene expression profiling reveals differential kinetic response of HSPs and UPR genes is associated with PI resistance in multiple myeloma'. *Blood Cancer Journal*, 2020;10(7):78-85. <https://doi.org/10.1038/s41408-020-00344-9>
88. Mitra AK, Mukherjee UK, Harding T, Jang JS, Stessman H, Li Y, Abyzov A, Jen J, Kumar S, Rajkumar V, Van Ness B. Single-cell analysis of targeted transcriptome predicts drug sensitivity of single cells within human myeloma tumors'. *Leukemia*, 2016; 30(5):1094–1102. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.361>
89. Moehler T, Goldschmidt H. *Multiple myeloma*. Springer. 2011:239-273.
90. Mohty M, Harousseau JL. *Handbook of multiple myeloma*. 2015:29-41.
91. Monlish DA, Bhatt ST, Schuettpeitz LG. The Role of Toll-Like Receptors in Hematopoietic Malignancies'. *Frontiers in Immunology*, 2016; 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00390>
92. Moreau P, Chanan-Khan A, Roberts AW, Agarwal AB, Facon T, Kumar S, Touzeau C, Punnoose EA, Cordero J, Munasinghe W, Jia J, Salem AH, Freise KJ, Leverson JD, Enschede SH, Ross JA, Maciag PC, Verdugo M, Harrison S. J. Promising efficacy and acceptable safety of venetoclax plus bortezomib and dexamethasone in relapsed/refractory MM. *Blood*, 2017; 130(22):2392–2400. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-788323>
93. Moreau P, Richardson PG, Cavo M, Orlowski RZ, San Miguel JF, Palumbo A, Harousseau JL. (). 'Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later'. *Blood*, 2012; 120(5). <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-403733>
94. Müller E, Christopoulos PF, Halder S, Lunde A, Beraki K, Speth M, Øynebråten I, Corthay A. (). 'Toll-Like Receptor Ligands and Interferon-γ Synergize for Induction of Antitumor M1 Macrophages'. *Frontiers in Immunology*, 2017; 8:1383-1391. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01383>
95. Munshi NC, Anderson KC. *Advances in biology and therapy of multiple myeloma*. Springer. 2013:157-180.
96. Narayanan KB, Park HH. Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-mediated cellular signaling pathways'. *Apoptosis*, 2015;20(2). <https://doi.org/10.1007/s10495-014-1073-1>
97. Nilsson K, Bennich H, Johansson SG, Pontén J. Established immunoglobulin producing myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from an IgE myeloma patient'. *Clinical and Experimental Immunology*, 1970; 7(4).
98. Nozomi N, Satoru K, Masashi S. Toll-like receptor 3 signaling induces apoptosis in human head and neck cancer via survivin associated pathway'. *Oncology Reports*, 2010; 24(1):225-231. <https://doi.org/10.3892/or.00000850>

99. Noreen M, Arshad M. Association of TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, and TIRAP polymorphisms with disease susceptibility'. *Immunologic Research*, 2015; 62(2):234–252. <https://doi.org/10.1007/s12026-015-8640-6>
100. Norris EJ, DeStephanis D, Tunquist B, Usmani S, Ganapathi R, Ganapathi M. Cytotoxic efficacy of filanesib and melphalan combination is governed by sequence of treatment in human myeloma cells'. *Blood Cancer Journal*, 2016; 6(10):480–480. <https://doi.org/10.1038/bcj.2016.92>
101. Öksüzoğlu E, Kozalak G. Inhibition of apoptosis may lead to the development of bortezomib resistance in multiple myeloma cancer cells'. *Turkish Journal of Biochemistry*, 2021; 46(1):65–71. <https://doi.org/10.1515/tjb-2019-0521>
102. Oliver W, Lichtman MA, Leonard JP, Williams WJ. *Williams hematology*. 2018:262-304.
103. Oosenbrug T, Graaff MJ, Haks MC, Kasteren S, Rensing ME. An alternative model for type I interferon induction downstream of human TLR2'. *Journal of Biological Chemistry*, 2020; 295(42). <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015283>
104. Park J, Ayyappan V, Bae EK, Lee C, Kim BS, Kim BK, Lee YY, Ahn KS, Yoon SS. Curcumin in combination with bortezomib synergistically induced apoptosis in human multiple myeloma U266 cells'. *Molecular Oncology*, 2008; 2(4):317–326. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2008.09.006>
105. Park JH, Ko R, Lee SY. Reciprocal regulation of TLR2-mediated IFN- β production by SHP2 and Gsk3 β '. *Scientific Reports*, 2017; 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07316-3>
106. Paveljšek D, Ivičak-Kocjan K, Treven P, Benčina M, Jerala R, Rogelj I. Distinctive probiotic features share common TLR2 -dependent signalling in intestinal epithelial cells'. *Cellular Microbiology*, 2021; 23(1).<https://doi.org/10.1111/cmi.13264>
107. Pellat-Deceunynk, C, Amiot M, Bataille R, Van Riet I, Van Camp B, Omede P, Boccadoro M. Human myeloma cell lines as a tool for studying the biology of multiple myeloma: A reappraisal 18 years after [letter]'. *Blood*, 1995; 86(10). <https://doi.org/10.1182/blood.V86.10.4001.bloodjournal86104001>
108. Picca A, Calvani R, Coelho-Junior HJ, Marzetti E. Cell Death and Inflammation: The Role of Mitochondria in Health and Disease'. *Cells*, 2021; 10(3):537-546. <https://doi.org/10.3390/cells10030537>
109. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis'. *Cell Death and Differentiation*, 1999; 6(2):99–104. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400476>
110. Provan D, Gribben J. *Molecular hematology* (4th edition). Wiley-Blackwell. 2020:121-131.
111. Punnoose EA, Leverson JD, Peale F, Boghaert ER, Belmont LD, Tan N, Young A, Mitten M, Ingalla E, Darbonne WC, Oleksijew A, Tapang P, Yue P, Oeh J, Lee L, Maiga S, Fairbrother WJ, Amiot M, Souers AJ, Sampath D. Expression Profile of BCL-2, BCL-XL, and MCL-1 Predicts Pharmacological Response to the BCL-2 Selective Antagonist Venetoclax in Multiple Myeloma Models'. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2016; 15(5):1132–1144. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0730>

112. Raedler LA. Ninlaro (Ixazomib): First Oral Proteasome Inhibitor Approved for the Treatment of Patients with Relapsed or Refractory Multiple Myeloma'. *American Health & Drug Benefits*, 2016; 9(1). PMID: 27668055
113. Ramzi M, Khalafi-Nezhad A, Irvani-Saadi M, Jowkar Z. Association between TLR2 and TLR4 Expression and Response to Induction Therapy in Acute Myeloid Leukemia Patients'. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research*, 2018; 12(4). PMID: 30774831
114. Ray A, Tian Z, Das DS, Coffman RL, Richardson P, Chauhan
115. D, Anderson KC. A novel TLR-9 agonist C792 inhibits plasmacytoid dendritic cell-induced myeloma cell growth and enhances cytotoxicity of bortezomib'. *Leukemia*, 2014; 28(8). <https://doi.org/10.1038/leu.2014.46>
116. Roberts A, Huang D. Targeting BCL2 with BH3 Mimetics: Basic Science and Clinical Application of Venetoclax in Chronic Lymphocytic Leukemia and Related B Cell Malignancies: Basic science and clinical application of venetoclax'. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2017; 101(1):89–98. <https://doi.org/10.1002/cpt.553>
117. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, Kipps TJ, Anderson MA, Brown JR, Gressick L, Wong S, Dunbar M, Zhu M, Desai MB, Cerri E, Heitner-Enschede S, Humerickhouse RA, Wierda WG, Seymour JF. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia'. *New England Journal of Medicine*, 2016; 374(4). <https://doi.org/10.1056/NEJMoA1513257>
118. Roberts AW, Stilgenbauer S, Seymour JF, Huang DCS. Venetoclax in Patients with Previously Treated Chronic Lymphocytic Leukemia'. *Clinical Cancer Research*, 2017; 23(16). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0955>
119. Rosebeck S, Alonge MM, Kandarpa M, Mayampurath A, Volchenboum SL, Jasielec J, Dytfeld D, Maxwell SP, Kraftson SJ, McCauley D, Shacham S, Kauffman M, Jakubowiak AJ. Synergistic Myeloma Cell Death via Novel Intracellular Activation of Caspase-10–Dependent Apoptosis by Carfilzomib and Selinexor'. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2016; 15(1):60–71. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0488>
120. Rossi D. Venetoclax: A new weapon to treat high-risk CLL'. *The Lancet Oncology*, 2016; 17(6). [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30100-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30100-0)
121. Roy P, Sarkar U, Basak S. The NF- κ B Activating Pathways in Multiple Myeloma'. *Biomedicine*, 2018; 6(2):59-69. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6020059>
122. Ruckdeschel K, Pfaffinger G, Haase R, Sing A, Weighardt H, Häcker G, Holzmann B, Heesemann J. Signaling of Apoptosis through TLRs Critically Involves Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adapter Inducing IFN- β , but Not MyD88, in Bacteria-Infected Murine Macrophages'. *The Journal of Immunology*, 2004; 173(5). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.3320>
123. Salaun B, Coste I, Rissoan MC, Lebecque SJ, Renno T. TLR3 Can Directly Trigger Apoptosis in Human Cancer Cells'. *The Journal of Immunology*, 2006; 176(8):324-336. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.8.4894>
124. Sánchez-Cuaxospa M, Contreras-Ramos A, Pérez-Figueroa E, Medina-Sansón A, Jiménez-Hernández E, Torres-Nava JR, Rojas-Castillo E, Maldonado-Bernal C.

- Low expression of Toll-like receptors in peripheral blood mononuclear cells of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia'. *International Journal of Oncology*, 2016; 49(2). <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3569>
125. Sarin V, Yu K, Ferguson ID, Gugliemini O, Nix MA, Hann B, Sirota M, Wiita AP. Evaluating the efficacy of multiple myeloma cell lines as models for patient tumors via transcriptomic correlation analysis'. *Leukemia*, 2020; 34(10):10-17. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0785-1>
 126. Scalzulli E, Grammatico S, Vozella F, Petrucci MT. Proteasome inhibitors for the treatment of multiple myeloma'. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2018; 19(4). <https://doi.org/10.1080/14656566.2018.1441287>
 127. Schäfer J, Welti L, Seckinger A, Burhenne J, Theile D, Weiss J. Cellular effect and efficacy of carfilzomib depends on cellular net concentration gradient'. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2017; 80(1):71–79. <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3335-4>
 128. Seiller C, Maiga S, Touzeau C, Bellanger C, Kervoëlen C, Descamps G, Maillet L, Moreau P, Pellat-Deceunynck C, Gomez-Bougie P, Amiot M. Dual targeting of BCL2 and MCL1 rescues myeloma cells resistant to BCL2 and MCL1 inhibitors associated with the formation of BAX/BAK hetero-complexes'. *Cell Death & Disease*, 2020; 11(5):316-323. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2505-1>
 129. Shah JJ, Orlowski RZ. Proteasome inhibitors in the treatment of multiple myeloma'. *Leukemia*, 2009; 23(11). <https://doi.org/10.1038/leu.2009.173>
 130. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases'. *Cell Death & Differentiation*, 2015; 22(4):526–539. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.216>
 131. So EY, Ouchi T. The application of Toll like receptors for cancer therapy'. *International Journal of Biological Sciences*, 2010; 675–681. <https://doi.org/10.7150/ijbs.6.675>
 132. Staudinger M, Glorius P, Burger R, Kellner C, Klausz K, Günther A, Repp R, Klapper W, Gramatzki M, Peipp M. The novel immunotoxin HM1.24-ETA' induces apoptosis in multiple myeloma cells'. *Blood Cancer Journal*, 2014; 4(6). <https://doi.org/10.1038/bcj.2014.38>
 133. Steinhagen F, Kinjo T, Bode C, Klinman DM. TLR-based immune adjuvants'. *Vaccine*, 2011;29(17). <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.08.002>
 134. Szczepański M, Stelmachowska M, Stryczyński Ł, Golusiński W, Samara H, Mozer-Lisewska I, Żeromski J. Assessment of expression of toll-like receptors 2, 3 and 4 in laryngeal carcinoma'. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 2007; 264(5):525–530. <https://doi.org/10.1007/s00405-006-0215-7>
 135. Tahir SK, Smith ML, Hessler P, Rapp LR, Idler KB, Park CH, Levenson JD, Lam LT. Potential mechanisms of resistance to venetoclax and strategies to circumvent it'. *BMC Cancer*, 2017; 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3383-5>
 136. Tait SWG, Vries E, Maas C, Keller AM, D'Santos CS, Borst J. Apoptosis induction by Bid requires unconventional ubiquitination and degradation of its N-terminal fragment'. *Journal of Cell Biology*, 2007; 179(7):1453–1466. <https://doi.org/10.1083/jcb.200707063>

137. Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system'. *International Immunopharmacology*, 2001; 1(4).[https://doi.org/10.1016/s1567-5769\(01\)00010-8](https://doi.org/10.1016/s1567-5769(01)00010-8)
138. Terzi H, Ergül M. In vitro comparison of cytotoxic effects of bortezomib resistant U266 myeloma cell line (U266/VELR) on combination of ibrutinib with carfilzomib and lenalidomide drugs'. *Cumhuriyet Medical Journal*. 2019; 41(4): 698-702. <https://doi.org/10.7197/cmj.vi.664928>
139. Tessoulin B, Moreau-Aubry A, Descamps G, Gomez-Bougie P, Maïga S, Gaignard A, Chiron D, Ménoret E, Le Gouill S, Moreau P, Amiot M, Pellat-Deceunynck C. Whole-exon sequencing of human myeloma cell lines shows mutations related to myeloma patients at relapse with major hits in the DNA regulation and repair pathways'. *Journal of Hematology & Oncology*, 2018; 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0679-0>
140. Thakur KK, Bolshette NB, Trandafir C, Jamdade VS, Istrate A, Gogoi R, Cucuianu A. Role of toll-like receptors in multiple myeloma and recent advances'. *Experimental Hematology*, 2015; 43(3). <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2014.11.003>
141. Tomlin FM, Gerling-Driessen UIM, Liu YC, Flynn RA, Vangala JR, Lentz CS, Clauser-Muenster S, Jakob P, Mueller WF, Ordoñez-Rueda D, Paulsen M, Matsui N, Foley D, Rafalko A, Suzuki T, Bogoy M, Steinmetz LM, Radhakrishnan SK, Bertozzi CR. Inhibition of NGLY1 inactivates the Transcription Factor Nrf1 and Potentiates Proteasome Inhibitor Cytotoxicity'. *ACS Central Science*, 2017; 3(11):1143–1155. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.7b00224>
142. Touzeau C, Dousset C, Le Gouill S, Sampath D, Leverson JD, Souers AJ, Maïga S, Béné MC, Moreau P, Pellat-Deceunynck C, Amiot M. The Bcl-2 specific BH3 mimetic ABT-199: A promising targeted therapy for t(11;14) multiple myeloma'. *Leukemia*, 2014; 28(1):210–212. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.216>
143. Touzeau C, Maciag P, Amiot M, Moreau P. Targeting Bcl-2 for the treatment of multiple myeloma'. *Leukemia*, 2018; 32(9). <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0223-9>
144. Triantafilou M, Gamper FGJ, Haston RM, Mouratis MA, Morath S, Hartung T, Triantafilou K. Membrane Sorting of Toll-like Receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 Heterodimers at the Cell Surface Determines Heterotypic Associations with CD36 and Intracellular Targeting'. *Journal of Biological Chemistry*, 2006; 281(41). <https://doi.org/10.1074/jbc.M602794200>
145. Turgeon ML. *Clinical hematology: Theory and procedures*. 2012:337-361.
146. Usmani SZ, Nooka, AK. *Personalized therapy for multiple myeloma*. Springer. 2018:77-103.
147. Van Opdenbosch N, Lamkanfi M. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease'. *Immunity*, 2019;50(6):1352–1364.<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.05.020>
148. Vikova V, Jourdan M, Robert N, Requirand G, Boireau S, Bruyer A, Vincent L, Cartron G, Klein B, Elemento O, Kassambara A, Moreaux J. Comprehensive characterization of the mutational landscape in multiple myeloma cell lines reveals potential drivers and pathways associated with tumor progression and drug resistance'. *Theranostics*, 2019; 9(2). <https://doi.org/10.7150/thno.28374>

149. Vrábel D, Pour L, Ševčíková S. The impact of NF- κ B signaling on pathogenesis and current treatment strategies in multiple myeloma'. *Blood Reviews*, 2019; 34:56–66. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2018.11.003>
150. Walsby EJ, Pratt G, Hewamana S, Crooks PA, Burnett AK, Fegan C, Pepper C. The NF- κ B Inhibitor LC-1 Has Single Agent Activity in Multiple Myeloma Cells and Synergizes with Bortezomib'. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2010; 9(6):1574–1582. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0104>
151. Wang JQ, Li JY, Teng QX, Lei ZN, Ji N, Cui Q, Zeng L, Pan Y, Yang DH, Chen ZS. Venetoclax, a BCL-2 Inhibitor, Enhances the Efficacy of Chemotherapeutic Agents in Wild-Type ABCG2-Overexpression-Mediated MDR Cancer Cells'. *Cancers*, 2020; 12(2):466–471. <https://doi.org/10.3390/cancers12020466>
152. Wang X, Wang J, Liu L, Liang G, Chen X, Xu X. Expression and clinical significance of TLR2 in laryngeal carcinoma tissue'. *Journal of Clinical Otorhinolaryngology, Head, and Neck Surgery*, 2013; 27(12):629–632. PMID: 24015628
153. Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ. TBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c'. *Genes & Development*, 2000; 14(16):2060–2071. PMID: 10950869
154. Weir GM, Karkada M, Hoskin D, Stanford MM, MacDonald L, Mansour M, Liwski RS. Combination of poly I:C and Pam3CSK4 enhances activation of B cells in vitro and boosts antibody responses to protein vaccines in vivo'. *PLOS ONE*, 2017; 12(6):73–79. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180073>
155. Wong AHH, Shin EM, Tergaonkar V, Chng WJ. Targeting NF- κ B Signaling for Multiple Myeloma'. *Cancers*, 2020; 12(8):2203–2210. <https://doi.org/10.3390/cancers12082203>
156. Xu Y, Zhao Y, Huang H, Chen G, Wu X, Wang Y, Chang W, Zhu Z, Feng Y, Wu D. Expression and function of toll-like receptors in multiple myeloma patients: Toll-like receptor ligands promote multiple myeloma cell growth and survival via activation of nuclear factor- κ B: Expression and Function of TLRs in MM Patients'. *British Journal of Haematology*, 2010; 150(5). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08284.x>
157. Yoshioka T, Morimoto Y, Iwagaki H, Itoh H, Saito S, Kobayashi N, Yagi T, Tanaka N. Bacterial Lipopolysaccharide Induces Transforming Growth Factor β and Hepatocyte Growth Factor through Tolllike Receptor 2 in Cultured Human Colon Cancer Cells'. *Journal of International Medical Research*, 2001; 29(5):409–420. <https://doi.org/10.1177/147323000102900505>
158. Yu Y, Yip KH, Tam IYS, Sam SW, Ng CW, Zhang W, Lau HYA. (). 'Differential effects of the Toll-like receptor 2 agonists, PGN and Pam3CSK4 on anti-IgE induced human mast cell activation'. *PloS One*, 2014; 9(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112989>
159. Zhang X, Adwal A, Turner AG, Callen DF, Abell AD. New Peptidomimetic Boronates for Selective Inhibition of the Chymotrypsin-like Activity of the 26S Proteasome'. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2016; 7(12):1039–1043. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.6b00217>

EKLER

EK-1: İntihal Yazılım Programı Raporu



2022-11-04 10:59:37.0

Benzerlik Raporu

Arş.Grv. Kamuran AVCI adına yüklenen "**Multiple Miyeloma'da Toll Like Reseptörleri ve Sinyal Yolu Bileşenlerinin Hastalık Patolojisiyle İlişkisinin İncelenmesi Doktora Tez Çalışması**" isimli eserin benzerlik testi yapılmıştır. Test sonucunda benzerlik oranı %10 bulunmuştur.



Doküman Kodu : 440644_1667548748001

Doküman Kodu ile bu dokümanın doğruluğu
<https://app.intihal.net/kontrol.jsp> adresinden kontrol edilebilir.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Kamuran AVCI

EĞİTİM

Lisans : Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi (2011)

Yüksek Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı (2016)

Doktora : Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı (2022)

YABANCI DİL

İngilizce: 86.25 (YDS 2016)

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2013 - 2018	Afyon Kocatepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik ABD	Sitogenetik Laboratuvarı
2018 - 2022	Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik ABD	Sitogenetik Laboratuvarı
2022 -	Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik ABD	Moleküler Genetik Laboratuvarı

YAYINLAR / BİLİMSEL ETKİNLİK

Araştırmacı Olarak Katılınan Çalışmalar:

- **Yüksek Lisans Tez Çalışması** Obez Bireylerde Transmembran Protein 18 (TMEM18) ve Sinirsel büyüme regülatörü 1 (NEGR1) Gen Polimorfizmlerinin Vücut Kitle Endeksi Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Afyon Kocatepe Üniversitesi BAPK Projesi, 15.SAĞ.BİL.11, Yardımcı Araştırmacı, 20 08 2015- 20-02-2017.
- **Girişimsel Olmayan Klinik Araştırma** Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Hsp90 Ve Histon Deasetilaz İnhibitörlerinin Sinerjistik Etkisinin Araştırılması. Afyon Kocatepe Üniversitesi BAPK Projesi, 16.KARİYER.190, Yardımcı Araştırmacı, 11.11.2016 – 03.12.2019.
- **Doktora Tez Çalışması** Multiple Miyeloma’da Toll Like Reseptörleri ve Sinyal Yolu Bileşenlerinin Hastalık Patolojisiyle İlişkisinin İncelenmesi. Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi BAPK Projesi, 19.DOK.003, Yardımcı Araştırmacı, 03 09 2019 -

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

- Double Trizomili (48,XXX,+21) Down Sendromlu Bir Çocuk: Olgu Sunumu Kamuran Avcı1, Saliha Handan Gönenli Yıldız1, Muhsin ELMAS1, Müjgan Özdemir Erdoğan1, Mustafa SOLAK1, Nermin Akçalı, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik ABD, Afyonkarahisar, V. Uluslararası Katılımlı Erciyes Tıp Genetik Günleri Kongresi 20-22 Şubat 2020 Kapadokya – Nevşehir 21-23 Şubat 2020

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

- İnfertil Bir Olguda Homozigot Perisentrik İnversiyon 9. GMJ 2014; 25:116-117

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

- Comparative investigation of the use of various commercial microcarriers as a substrate for culturing mammalian cells. Ayyildiz-Tamis D, Avcı K, Deliloglu-Gurhan S I. In Vitro Cell Dev Biol-Animal, March, 50: 221-231, (2014). (*SCI EXPANDED*, DOI 10.1007/s11626-013-9717-y)

- Özdemir Erdoğan M., Avcı K., Gönenli Yıldız S.H., Arıkan Terzi E.S., Söylemez Z., Varol N., **Solak M.**, “Effect of gene polymorphisms in transmembrane protein 18 (TMEM18) and neuronal growth regulator 1 (NEGR1) on body mass index in obese subjects”. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(6): 1567–1574, 2018. [DOI: 10.1080/13102818.2018.1533430].
- “Comparison of clinical parameters with whole exome sequencing analysis results of autosomal recessive patients; a center experience”. Elmas M., Yıldız H., Erdoğan M., Gogus B., Avcı K., Solak M. *Molecular Biology Reports*, 46:287–299, 2019. [doi.org/10.1007/s11033-018-4470-7].
- A Rare De Novo Robertsonian Translocation 45, XX, rob (13;13) (q10; q10) Karyotype Carrying in a Normal Woman; But Recurrent Abortions. Serap Tutgun Onrat, Muhsin Elmas, Kamuran Avcı. *Biomed J Sci & Tech Res* 36(1)- 2021. BJSTR. MS.ID.005784.