



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

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MULTİPLE MYELOMA'DA BORTEZOMİBE KARŞI GELİŞEN  
DİRENÇ MEKANİZMASINDA TOLL LİKE RESEPTÖRLERİN  
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Mehtap TARHAN**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Kamile ÖZTÜRK**

**AKSARAY, 2017**





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

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MULTİPLE MYELOMA'DA BORTEZOMİBE KARŞI GELİŞEN  
DİRENÇ MEKANİZMASINDA TOLL LİKE RESEPTÖRLERİN  
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Mehtap TARHAN**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Kamile ÖZTÜRK**

**AKSARAY, 2017**

**AKSARAY ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**ONAY BELGESİ**

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 142307407 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi, “Mehtap TARHAN”, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “MULTİPLE MYELOMA’DA BORTEZOMİBE KARŞI GELİŞEN DİRENÇ MEKANİZMASINDA TOLL LİKE RESEPTÖRLERİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI” başlıklı tezini, aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :**      **Doç. Dr. Kamile ÖZTÜRK**      .....  
                                 **Aksaray Üniversitesi**

**Jüri Üyeleri :**      **Prof. Dr. A. Kevser ÖZDEN**      .....  
                                 **Hacettepe Üniversitesi**

**Jüri Üyeleri :**      **Yrd. Doç. Dr. Emine ÖKSÜZOĞLU**      .....  
                                 **Aksaray Üniversitesi**

**Teslim Tarihi: 30 Mayıs 2017**

**Savunma Tarihi: 3 Temmuz 2017**

## ÖNSÖZ

Multiple myeloma (MM) kemik iliğindeki plazma hücrelerinin anormal proliferasyonu ve invazyonu ile karakterize edilen hematolojik bir kanserdir. MM, kronik lenfositik lösemiden sonra ikinci en yaygın hematolojik kanser olup, halen tedavi edilemeyen bir hastalıktır. MM tedavisinde günümüzde kullanılan en etkin tedavi yollardan birisi proteazom inhibitörü bortezomibin yer aldığı kemoterapötik rejimdir. Bortezomib, MM tedavisinde önemli bir başarı sağlamasına karşın, bortezomibe karşı gelişen direnç mekanizması tedavinin etkinliğini ciddi bir şekilde engellemektedir. Buna ek olarak, MM gelişimi ve ilerlemesinde kemik iliği mikroçevresinin önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu bilgiler ışığında, sunulan bu tez çalışmasında bağışıklık sisteminin ana elemanlarından olan ve kemik iliği mikroçevresinden alınan sinyallerin iletiminde potansiyel rolleri olan Toll Like Reseptör (TLR)'lerinin gen ifade düzeyleri araştırılarak, MM'da bortezomibe karşı gelişen direnç mekanizmasında TLR'lerin olası rollerinin saptanması amaçlanmıştır. Bu amaç için, bortezomibe dirençli (KMS20) ve bortezomibe hassas (KMS-28BM) MM hücre hatları kullanılmıştır. İlk olarak hücrelerin dirençliliği doğrulanmış ve KMS-20 için dirençlilik indeksi hesaplanmıştır. Ardından her iki hücre hattında bortezomibin TLR sinyal yolağına etkisi, TLR2, 3, 4, 7, 9 ve MyD88 gen ifade düzeylerinin qRT-PCR yöntemiyle saptanması ile araştırılmıştır. Bu tez çalışması, MM tedavisi için TLR'leri hedef alan yeni tedavi stratejileri geliştirilmesi için ön çalışma niteliğindedir.

Deneysel çalışmalar Aksaray Üniversitesi, Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi (ASÜBTAM)-Moleküler Biyoloji ve Metabolizma Laboratuvarı ve Hücre Kültür Laboratuvarında yapılmıştır.

“Multiple Myeloma’da Bortezomibe Karşı Gelişen Direnç Mekanizmasında Toll Like Reseptörlerin Rolünün Araştırılması” adlı tezim 2015-004 kodlu yüksek lisans projesi kapsamında Aksaray Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

## **DOĞRULUK BEYANI**

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ve bu eserleri her kullanışımında alıntı yaparak yararlandığımı belirtir; bunu şerefimle doğrularım.

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

**MEHTAP TARHAN**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca çalışmalarımın her aşamasında bilimsel görüşlerini ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili danışman hocam Doç. Dr. Kamile Öztürk'e

Eğitimim boyunca sevgisi ile maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Neslihan Tekin'e

Deneysel çalışmalarımın gerçekleşmesi için hücrelerin temininde emeği geçen ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Emine Öksüzöğlü'na ve Gül Kozalak'a

Deneysel çalışmalarımın gerçekleşmesinde bilgi ve birikimini esirgemeyen Barış Kerimoğlu'na Çalışmalarımın istatistiksel olarak değerlendirilmesinde emeği geçen sevgili hocam Prof. Dr. İbrahim Örün'e ve Çiğdem Ekin'e

Deneysel aşamalarımı gerçekleştirdiğim Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışanlara ve arkadaşlarıma,

Her zaman özveri, sabır ve sevgileriyle destek olan haklarını ödeyemeyeceğim babam Kemal Tarhan'a annem Sahir Tarhan'a abilerim Mustafa ve Melih Tarhan'a ikizim Meltem Tarhan'a teşekkürü borç bilirim.

“Multiple Myeloma Hücre Hatlarında Toll Like Reseptörlerin İfade Düzeylerinin Araştırılması” adlı, 2015-04 nolu yüksek lisans projesine desteğinden dolayı Aksaray Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine,

2010-C kodlu yurtiçi yüksek lisans burs programı kapsamında “Multiple Myeloma’da Bortezomibe Karşı Gelişen Direnç Mekanizmasında Toll Like Reseptörlerin Rolünün Araştırılması” adlı, tezime desteğinden dolayı TÜBİTAK’a teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

|                                                                | <u>Sayfa</u> |
|----------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>ÖNSÖZ</b> .....                                             | <b>i</b>     |
| <b>DOĞRULUK BEYANI</b> .....                                   | <b>ii</b>    |
| <b>TEŞEKKÜR</b> .....                                          | <b>iii</b>   |
| <b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....                                | <b>iv</b>    |
| <b>ÖZET</b> .....                                              | <b>vi</b>    |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                          | <b>vii</b>   |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....                                   | <b>viii</b>  |
| <b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....                                 | <b>xi</b>    |
| <b>SİMGELER DİZİNİ</b> .....                                   | <b>xii</b>   |
| <b>KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....                                | <b>xiii</b>  |
| <b>1. GİRİŞ</b> .....                                          | <b>1</b>     |
| <b>2. LİTERATÜR ÖZETİ</b> .....                                | <b>4</b>     |
| 2.1 Multiple myeloma (MM) .....                                | 4            |
| 2.2 MM Tanısı.....                                             | 7            |
| 2.3 MM'nın Sınıflandırılması .....                             | 8            |
| 2.4 MM'nın Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi .....                | 9            |
| 2.5 MM Tedavisi.....                                           | 10           |
| 2.6 Bortezomib.....                                            | 11           |
| 2.6.1 Proteazom kompleksi .....                                | 11           |
| 2.6.2 Nükleer faktör kappa B (NFκB).....                       | 12           |
| 2.7 Kanserde İlaç Direnç Mekanizması .....                     | 14           |
| 2.7.1 MM'da bortezomibe karşı gelişen direnç mekanizması ..... | 15           |
| 2.8 MM Mikroçevresi .....                                      | 16           |
| 2.9 Toll Like Reseptörler (TLR) .....                          | 17           |
| 2.9.1 TLR'in yapısı .....                                      | 19           |
| 2.9.2 TLR'in lokalizasyonu.....                                | 19           |
| 2.9.3 TLR'in ligandları .....                                  | 19           |
| 2.9.4 TLR'lerde sinyalizasyon .....                            | 22           |
| 2.9.4.1 MyD88'e bağımlı sinyal yolağı .....                    | 23           |
| 2.9.4.2 MyD88'den bağımsız (TRIF bağımlı) sinyal yolağı.....   | 24           |
| 2.9.5 TLR uyarılması; proliferasyon ve hayatta kalma.....      | 25           |
| 2.10 TLR'ler ve Kanser.....                                    | 27           |
| 2.11 TLR'lerin Anti-tümör Etkileri.....                        | 28           |
| 2.12 MM' da TLR Temelli Terapi .....                           | 29           |
| <b>3. MALZEME VE YÖNTEM</b> .....                              | <b>31</b>    |
| 3.1 Kullanılan Kimyasallar, Kitler ve Genler .....             | 31           |
| 3.2 Hücre Hatlarının Çoğaltılması ve Dondurulması.....         | 31           |
| 3.3 Hücre Canlılığının Saptanması .....                        | 32           |
| 3.4 Hücre Proliferasyon Testi .....                            | 33           |
| 3.4.1 Sitotoksikite testi: MTT testi .....                     | 33           |
| 3.5 KMS-20 ve KMS-28BM Hücre Hatlarında İlaç Uygulaması.....   | 33           |

|                                                                                                     |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.5.1 Bortezomib uygulanması .....                                                                  | 33        |
| 3.6 Dirençlilik İndeksi.....                                                                        | 34        |
| 3.7 RNA İzolasyon Aşaması .....                                                                     | 34        |
| 3.7.1 RNA miktarının ve saflığının belirlenmesi .....                                               | 35        |
| 3.8 Agoraz Jel Elektroforez Aşaması.....                                                            | 35        |
| 3.9 RT-PCR Yöntemi İle Gen İfade Düzeylerinin Saptanması .....                                      | 36        |
| 3.9.1 Komplementer DNA (cDNA) sentezi .....                                                         | 36        |
| 3.9.2 Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR).....                          | 37        |
| 3.9.3 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Yöntemi kullanılarak qRT-PCR ürünlerinin miktarının hesaplanması ..... | 39        |
| 3.10 İstatistiksel Değerlendirme.....                                                               | 39        |
| <b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>                                                                | <b>40</b> |
| 4.1 Hücre Hatlarının Çoğaltılması ve Canlılığı.....                                                 | 40        |
| 4.2 Sitotoksikite Testi: MTT Testi .....                                                            | 41        |
| 4.3 Bortezomib Uygulanması .....                                                                    | 41        |
| 4.3.1 KMS-20 hücre hatlarına 12, 24 ve 48 saatlik bortezomib uygulanması ...                        | 41        |
| 4.3.2 KMS-28BM hücre hattına 12, 24 ve 48 saatlik bortezomib uygulanması                            | 44        |
| 4.4 KMS-20 ve KMS-28BM hücre hatları RI (dirençlilik indeksi) hesabı.....                           | 47        |
| 4.5 KMS-20 ve KMS-28BM Hücre Hatlarında RNA İzolasyon Aşaması .....                                 | 47        |
| 4.6 Gen Ekspresyon Analizleri .....                                                                 | 48        |
| 4.6.1 TLR2 gen ifade düzeyleri.....                                                                 | 49        |
| 4.6.1.1 KMS-20 hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR2 gen ifade düzeyleri .....       | 49        |
| 4.6.1.2 KMS-28BM hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR2 gen ifade düzeyleri.....      | 52        |
| 4.6.2 TLR3 gen ifade düzeyleri.....                                                                 | 55        |
| 4.6.2.1 KMS-28BM hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR3 gen ifade düzeyleri.....      | 56        |
| 4.6.3 TLR4 gen ifade düzeyleri.....                                                                 | 58        |
| 4.6.3.1 KMS-28BM hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR4 gen ifade düzeyleri.....      | 59        |
| 4.6.4 TLR7 gen ifade düzeyleri.....                                                                 | 61        |
| 4.6.4.1 KMS-20 hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR7 gen ifade düzeyleri .....       | 62        |
| 4.6.4.2 KMS-28BM hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR7 gen ifade düzeyleri.....      | 64        |
| 4.6.5 TLR9 gen ifade düzeyleri.....                                                                 | 67        |
| 4.6.5.1 KMS-20 hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR9 gen ifade düzeyleri .....       | 67        |
| 4.6.5.2 KMS-28BM hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR9 gen ifade düzeyleri.....      | 70        |
| 4.6.6 MyD88 gen ifade düzeyleri.....                                                                | 73        |
| 4.6.6.1 KMS-20 hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı MyD88 gen ifade düzeyleri .....      | 74        |
| 4.6.6.2 KMS-28BM hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı MyD88 gen ifade düzeyleri.....     | 77        |
| <b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>                                                                | <b>83</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>                                                                              | <b>85</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>                                                                                | <b>94</b> |

## ÖZET

### MULTIPLE MYELOMA'DA BORTEZOMİBE KARŞI GELİŞEN DİRENÇ MEKANİZMASINDA TOLL LIKE RESEPTÖRLERİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Multiple myeloma (MM) kemik iliğindeki plazma hücrelerinin anormal proliferasyonu ve invazyonu ile karakterize edilen, tedavi edilemeyen hematolojik bir kanserdir. Günümüzde MM tedavisi için kullanılan en etkin tedavi yöntemlerinden birisi proteazom inhibitörü bortezomibin yer aldığı kemoterapötik rejimlerdir. Ancak bortezomibe karşı gelişen direnç mekanizması tedavinin başarısızlığına neden olmaktadır. Literatürde dirençlilik mekanizmasında rol aldığı bilinen birçok mekanizma çalışılmasına karşın, TLR'in ilaç dirençlilik mekanizmasındaki rolleri henüz aydınlatılmamıştır. Bu nedenle, bu tez çalışması ile MM hücre hatlarında bortezomibe karşı gelişen direnç mekanizmasında TLR'lerin rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaç için, bortezomibe dirençli (KMS-20) ve hassas (KMS-28BM) MM hücre hatları kullanılmıştır. İlk olarak, bortezomibin doza ve zamana bağlı hücre canlılığına etkisi, MTT testi kullanılarak saptanmıştır. İkinci olarak, hücre hatları farklı bortezomib konsantrasyonları ile 12, 24 ve 48 saat muamele edildikten sonra total RNA izolasyonu ve ardından cDNA sentezi yapılmıştır. TLR 2, 3, 4, 7, 9 ve MyD88 genlerinin mRNA düzeyleri her gene özgü primer ve TaqMan probolar kullanılarak real time RT-PCR yöntemi ile saptanmıştır.

KMS-20 hücre hattında bortezomibin 12, 24 ve 48 saat için IC<sub>50</sub> dozları sırasıyla 31.62nM; 15.85nM; 5.89nM olarak ve KMS-28BM hücre hattında ise 12, 24 ve 48 saat için IC<sub>50</sub> dozları sırasıyla 11.84nM; 5.30nM; 3.66nM olarak saptanmıştır. KMS-20 için 12, 24 ve 48 saatlik dirençlik indeksleri (RI) sırasıyla 2.67; 2.99 ve 1.61 olarak hesaplanmıştır. Gen ifade düzeylerine bakıldığında, TLR2 ifade düzeyinin dirençli hücrede hassas hücreye göre doz ve zaman bağlı olarak çok anlamlı azalış gösterdiği bulunmuştur. TLR3 ve TLR4 gen ifadesi hassas hücrede doz ve zamana bağlı azalış gösterirken, dirençli hücrelerde tamamen baskılanmıştır. TLR7 ifadesi hassas hücrede doza ve zaman bağlı azalış gösterirken, dirençli hücrede anlamlı bir artışa neden olmuştur. TLR9 hassas hücrede doz ve zamana bağlı anlamlı azalış gösterirken, dirençli hücrede sadece yüksek konsantrasyonlarda anlamlı azalma göstermiştir. MyD88 dirençli hücrede sadece 48 saatte anlamlı artış, hassasta özellikle 24 ve 48 saatte doza ve zamana bağlı azalma göstermiştir. Sonuçta, dirençli ve hassas hücrelerdeki tüm gen ifade düzeyleri karşılaştırıldığında, dirençli hücrelerde TLR2, TLR3 ve TLR4 mRNA düzeylerindeki azalmanın ya da tamamen baskılanmanın, buna karşın TLR7 ve MyD88 mRNA düzeylerindeki artışın bortezomibe karşı gelişen direnç mekanizmasında rol alabileceği görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Multiple myeloma, İlaç dirençliliği, Toll Like Reseptörler, qRT-PCR, Bortezomib.

## ABSTRACT

### RESEARCH OF TOLL LIKE RECEPTORS IN RESISTANCE MECHANISM AGAINST BORTEZOMIB IN MULTIPLE MYELOMA

Multiple myeloma (MM) is a hematologic malignancy that is characterized as an abnormal proliferation and invasion of plasma cells into the bone marrow. The most effective treatment method currently available for MM therapy is chemotherapeutic regimens in which the proteasome inhibitor bortezomib is involved. However, resistance mechanism against bortezomib causes failure of treatment. Despite the study of many mechanisms known to play a role in the resistance mechanism in the literature, the role of TLR in drug resistance has not yet been elucidated. Therefore, this thesis study aimed to investigate the role of TLRs in the resistance mechanism against bortezomib in MM cell lines.

For this purpose, bortezomib-resistant (KMS-20) and sensitive (KMS-28BM) MM cell lines were used. Firstly, it was determined the dose and time dependent effects of bortezomib for two cell lines on cell viability by using MTT test. Secondly, cell lines were treated with different concentrations of bortezomib for 12, 24 and 48 hours, followed by total RNA isolation followed by cDNA synthesis. mRNA levels of TLR 2, 3, 4, 7, 9 and MyD88 genes were determined by real-time RT-PCR using primers specific for each gene and TaqMan probes.

IC<sub>50</sub> doses in the 12, 24 and 48 hours for KMS-20 cell line were, respectively; 31.62 nM; 15.85nM; 5.89 nM and IC<sub>50</sub> doses in the 12, 24 and 48 hours for KMS-28BM cell line were, respectively; 11.84 nM; 5.30nM; 3.66 nM. The resistance index (RI) of KMS-20 cell line for 12, 24 and 48 hours were 2.67; 2.99 and 1.61 respectively. When gene expression levels were examined, TLR2 expression levels were found to be significantly decreased in resistant cells compared to sensitive cells, depending on dose and time. While TLR3 and TLR4 gene expression showed dose and time dependent decrease in sensitive cells, they were completely suppressed in resistant cells. While the TLR7 expression showed a dose-dependent and time-dependent decrease in the sensitive cell, it was shown a significantly increase in the resistant cell. TLR9 showed a significant decrease in dose and time in sensitive cells, while a significant decrease in only high concentrations in resistant cells. A significant increase in only 48 hours in the MyD88 resistant cell showed, while a significantly decrease showed at 24 and 48 hours in sensitive cells.

Finally, when all gene expression levels in resistant and sensitive cells are compared, the decrease or complete suppression of TLR2, TLR3 and TLR4 mRNA levels, but the increase of TLR7 and MyD88 mRNA levels in resistant cells may play a role in the resistance mechanism against bortezomib.

**Keywords:** Multiple myeloma, Drug Resistance, Toll Like Receptors, qRT-PCR, Bortezomib.

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

|                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1: Plazma hücre farklılaşması ve morfolojisi .....                                                             | 5  |
| Şekil 2.2: İmmünoglobülin yapısı. ....                                                                                 | 6  |
| Şekil 2.3: Bortezomibin kimyasal yapısı. ....                                                                          | 11 |
| Şekil 2.4: Proteazom kompleksi. ....                                                                                   | 12 |
| Şekil 2.5: Kanser hücrelerinde ilaca karşı gelişen direnç mekanizmaları .....                                          | 14 |
| Şekil 2.6: Bortezomibe karşı gelişen direnç mekanizması. ....                                                          | 15 |
| Şekil 2.7: TLR yapısı.....                                                                                             | 19 |
| Şekil 2.8: TLR lokalizasyonu ve ligandları. ....                                                                       | 21 |
| Şekil 2.9: TLR sinyal yolağı.....                                                                                      | 23 |
| Şekil 2.10: MyD88'e bağımlı ve bağımsız TLR sinyal yolağı. ....                                                        | 25 |
| Şekil 2.11: MM' da TLR'in şematik görünümü .....                                                                       | 27 |
| Şekil 3.1: TaqMan probun çalışma prensibi .....                                                                        | 38 |
| Şekil 3.2: qRT-PCR amplifikasyon basamakları.....                                                                      | 39 |
| Şekil 4.1: KMS-20 hücre hattına ait 40X objektif görüntüsü.....                                                        | 40 |
| Şekil 4.2: KMS-28BM hücre hattına ait 40X objektif görüntüsü.....                                                      | 40 |
| Şekil 4.3: 12 saatlik bortezomib uygulamasının KMS-20 hücre hattındaki %<br>canlılığa etkisi. ....                     | 42 |
| Şekil 4.4: 24 saatlik bortezomib uygulamasının KMS-20 hücre hattındaki %<br>canlılığa etkisi. ....                     | 43 |
| Şekil 4.5: 48 saatlik bortezomib uygulamasının KMS-20 hücre hattındaki %<br>canlılığa etkisi. ....                     | 43 |
| Şekil 4.6: Bortezomibin KMS-20 hücre hattındaki % canlılığa etkisi. ....                                               | 44 |
| Şekil 4.7: 12 saatlik bortezomib uygulamasının KMS-28BM hücre hattındaki %<br>canlılığa etkisi. ....                   | 45 |
| Şekil 4.8: 24 saatlik bortezomib uygulamasının KMS-28BM hücre hattındaki %<br>canlılığa etkisi .....                   | 45 |
| Şekil 4.9: 48 saatlik bortezomib uygulamasının KMS-28BM hücre hattındaki %<br>canlılığa etkisi. ....                   | 46 |
| Şekil 4.10: Bortezomibin KMS-28BM hücre hattındaki % canlılığa etkisi. ....                                            | 46 |
| Şekil 4.11: Total RNA'ların %1'lik agaroz jel görüntüsü. ....                                                          | 47 |
| Şekil 4.12: KMS-28BM kontrol grubunun 12 saatlik RT-PCR verimlilik grafiği. ...                                        | 48 |
| Şekil 4.13: KMS-20 hücre hattında 12 saatlik bortezomib uygulamasının TLR2<br>gen ifade düzeyine etkisi.....           | 50 |
| Şekil 4.14: KMS-20 hücre hattında 24 saatlik bortezomib uygulamasının TLR2<br>gen ifade düzeyine etkisi.....           | 50 |
| Şekil 4.15: KMS-20 hücre hattında 48 saatlik bortezomib uygulamasının TLR2<br>gen ifade düzeyine etkisi.....           | 51 |
| Şekil 4.16: KMS-20 hücre hattında 12, 24 ve 48 saatlik bortezomib<br>uygulamasının TLR2 gen ifade düzeyine etkisi..... | 52 |
| Şekil 4.17: KMS-28BM hücre hattında 12 saatlik bortezomib uygulamasının<br>TLR2 gen ifade düzeyine etkisi. ....        | 53 |
| Şekil 4.18: KMS-28BM hücre hattında 24 saatlik bortezomib uygulamasının                                                |    |

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| TLR2 gen ifade düzeyine etkisi. ....                                           | 53 |
| <b>Şekil 4.19:</b> KMS-28BM hücre hattında 48 saatlik bortezomib uygulamasının |    |
| TLR2 gen ifade düzeyine etkisi. ....                                           | 54 |
| <b>Şekil 4.20:</b> KMS-28BM hücre hattında 12, 24, 48 saatlik bortezomib       |    |
| uygulamasının TLR2 gen ifade düzeyine etkisi. ....                             | 55 |
| <b>Şekil 4.21:</b> KMS-28BM hücre hattında 12 saatlik bortezomib uygulamasının |    |
| TLR3 gen ifade düzeyine etkisi. ....                                           | 56 |
| <b>Şekil 4.22:</b> KMS-28BM hücre hattında 24 saatlik bortezomib uygulamasının |    |
| TLR3 gen ifade düzeyine etkisi. ....                                           | 57 |
| <b>Şekil 4.23:</b> KMS-28BM hücre hattında 48 saatlik bortezomib uygulamasının |    |
| TLR3 gen ifade düzeyine etkisi. ....                                           | 57 |
| <b>Şekil 4.24:</b> KMS-28BM hücre hattında 12, 24, 48 saatlik bortezomib       |    |
| uygulamasının TLR3 gen ifade düzeyine etkisi. ....                             | 58 |
| <b>Şekil 4.25:</b> KMS-28BM hücre hattında 12 saatlik bortezomib uygulamasının |    |
| TLR4 gen ifade düzeyine etkisi. ....                                           | 59 |
| <b>Şekil 4.26:</b> KMS-28BM hücre hattında 24 saatlik bortezomib uygulamasının |    |
| TLR4 gen ifade düzeyine etkisi. ....                                           | 60 |
| <b>Şekil 4.27:</b> KMS-28BM hücre hattında 48 saatlik bortezomib uygulamasının |    |
| TLR4 gen ifade düzeyine etkisi. ....                                           | 60 |
| <b>Şekil 4.28:</b> KMS-28BM hücre hattında 12, 24, 48 saatlik bortezomib       |    |
| uygulamasının TLR4 gen ifade düzeyine etkisi. ....                             | 61 |
| <b>Şekil 4.29:</b> KMS-20 hücre hattında 12 saatlik bortezomib uygulamasının   |    |
| TLR7 gen ifade düzeyine etkisi. ....                                           | 62 |
| <b>Şekil 4.30:</b> KMS-20 hücre hattında 24 saatlik bortezomib uygulamasının   |    |
| TLR7 gen ifade düzeyine etkisi. ....                                           | 63 |
| <b>Şekil 4.31:</b> KMS-20 hücre hattında 48 saatlik bortezomib uygulamasının   |    |
| TLR7 gen ifade düzeyine etkisi. ....                                           | 63 |
| <b>Şekil 4.32:</b> KMS-20 hücre hattında 12, 24 ve 48 bortezomib uygulamasının |    |
| TLR7 gen ifade düzeyine etkisi. ....                                           | 64 |
| <b>Şekil 4.33:</b> KMS-28BM hücre hattında 12 saatlik bortezomib uygulamasının |    |
| TLR7 gen ifade düzeyine etkisi. ....                                           | 65 |
| <b>Şekil 4.34:</b> KMS-28BM hücre hattında 24 saatlik bortezomib uygulamasının |    |
| TLR7 gen ifade düzeyine etkisi. ....                                           | 65 |
| <b>Şekil 4.35:</b> KMS-28BM hücre hattında 48 saatlik bortezomib uygulamasının |    |
| TLR7 gen ifade düzeyine etkisi. ....                                           | 66 |
| <b>Şekil 4.36:</b> KMS-28BM hücre hattında 12, 24 ve 48 saatlik bortezomib     |    |
| uygulamasının TLR7 gen ifade düzeyine etkisi. ....                             | 66 |
| <b>Şekil 4.37:</b> KMS-20 hücre hattında 12 saatlik bortezomib uygulamasının   |    |
| TLR9 gen ifade düzeyine etkisi. ....                                           | 68 |
| <b>Şekil 4.38:</b> KMS-20 hücre hattında 24 saatlik bortezomib uygulamasının   |    |
| TLR9 gen ifade düzeyine etkisi. ....                                           | 68 |
| <b>Şekil 4.39:</b> KMS-20 hücre hattında 48 saatlik bortezomib uygulamasının   |    |
| TLR9 gen ifade düzeyine etkisi. ....                                           | 69 |
| <b>Şekil 4.40:</b> KMS-20 hücre hattında 12, 24 ve 48 saatlik bortezomib       |    |
| uygulamasının TLR9 gen ifade düzeyine etkisi. ....                             | 70 |
| <b>Şekil 4.41:</b> KMS-28BM hücre hattında 12 saatlik bortezomib uygulamasının |    |
| TLR9 gen ifade düzeyine etkisi. ....                                           | 71 |
| <b>Şekil 4.42:</b> KMS-28BM hücre hattında 24 saatlik bortezomib uygulamasının |    |
| TLR9 gen ifade düzeyine etkisi. ....                                           | 71 |
| <b>Şekil 4.43:</b> KMS-28BM hücre hattında 48 saatlik bortezomib uygulamasının |    |

|                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TLR9 gen ifade düzeyine etkisi. ....                                                                                          | 72 |
| <b>Şekil 4.44:</b> KMS-28BM hücre hattında 12, 24 ve 48 saatlik bortezomib uygulamasının TLR9 gen ifade düzeyine etkisi. .... | 73 |
| <b>Şekil 4.45:</b> KMS-20 hücre hattında 12 saatlik bortezomib uygulamasının MyD88 gen ifade düzeyine etkisi. ....            | 74 |
| <b>Şekil 4.46:</b> KMS-20 hücre hattında 24 saatlik bortezomib uygulamasının MyD88 gen ifade düzeyine etkisi. ....            | 75 |
| <b>Şekil 4.47:</b> KMS-20 hücre hattında 48 saatlik bortezomib uygulamasının MyD88 gen ifade düzeyine etkisi. ....            | 75 |
| <b>Şekil 4.48:</b> KMS-20 hücre hattında 12, 24, 48 saatlik bortezomib uygulamasının MyD88 gen ifade düzeyine etkisi. ....    | 76 |
| <b>Şekil 4.49:</b> KMS-28BM hücre hattında 12 saatlik bortezomib uygulamasının MYD88 gen ifade düzeyine etkisi. ....          | 77 |
| <b>Şekil 4.50:</b> KMS-28BM hücre hattında 24 saatlik bortezomib uygulamasının MYD88 gen ifade düzeyine etkisi. ....          | 78 |
| <b>Şekil 4.51:</b> KMS-28BM hücre hattında 48 saatlik bortezomib uygulamasının MYD88 gen ifade düzeyine etkisi. ....          | 78 |
| <b>Şekil 4.52:</b> KMS-28BM hücre hattında 12, 24, 48 saatlik bortezomib uygulamasının MYD88 gen ifade düzeyine etkisi. ....  | 79 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

|                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 2.1:</b> MGUS, SMM ve Semptomatik myeloma tanı kriterleri .....                                                     | 9  |
| <b>Çizelge 2.2:</b> TLR'lerin immün sistem hücrelerinde dağılımı .....                                                         | 18 |
| <b>Çizelge 2.3:</b> TLR'in lokalizasyonu, ligandları ve sinyal adaptörü .....                                                  | 21 |
| <b>Çizelge 3.1:</b> cDNA karışımı için gerekli miktarlar .....                                                                 | 36 |
| <b>Çizelge 3.2:</b> cDNA sentez için gerekli PCR programı .....                                                                | 36 |
| <b>Çizelge 3.3:</b> qRT-PCR reaksiyon koşulları .....                                                                          | 38 |
| <b>Çizelge 4.1:</b> KMS-20 hücre hattındaki 12 saatlik bortezomib uygulamasının % canlılık ve standart sapma değerleri. ....   | 42 |
| <b>Çizelge 4.2:</b> KMS-20 hücre hattındaki 24 saatlik bortezomib uygulamasının % canlılık ve standart sapma değerleri. ....   | 42 |
| <b>Çizelge 4.3:</b> KMS-20 hücre hattındaki 48 saatlik bortezomib uygulamasının % canlılık ve standart sapma değerleri. ....   | 43 |
| <b>Çizelge 4.4:</b> KMS-28BM hücre hattındaki 12 saatlik bortezomib uygulamasının % canlılık ve standart sapma değerleri. .... | 44 |
| <b>Çizelge 4.5:</b> KMS-28BM hücre hattındaki 24 saatlik bortezomib uygulamasının % canlılık ve standart sapma değerleri. .... | 45 |
| <b>Çizelge 4.6:</b> KMS-28BM hücre hattındaki 48 saatlik bortezomib uygulamasının % canlılık ve standart sapma değerleri. .... | 46 |
| <b>Çizelge 4.7:</b> KMS-20'nin bortezomibe karşı dirençlilik indeksi .....                                                     | 47 |
| <b>Çizelge 4.8:</b> KMS-20 hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR2 gen ifade düzeylerine etkisi .....             | 49 |
| <b>Çizelge 4.9:</b> KMS-28BM hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR2 gen ifade düzeylerine etkisi .....           | 52 |
| <b>Çizelge 4.10:</b> KMS-28BM hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR3 gen ifade düzeylerine etkisi .....          | 56 |
| <b>Çizelge 4.11:</b> KMS-28BM hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR4 gen ifade düzeylerine etkisi .....          | 59 |
| <b>Çizelge 4.12:</b> KMS-20 hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR7 gen ifade düzeylerine etkisi .....            | 62 |
| <b>Çizelge 4.13:</b> KMS-28BM hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR7 gen ifade düzeylerine etkisi .....          | 64 |
| <b>Çizelge 4.14:</b> KMS-20 hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR9 gen ifade düzeylerine etkisi .....            | 67 |
| <b>Çizelge 4.15:</b> KMS-28BM hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR9 gen ifade düzeylerine etkisi .....          | 70 |
| <b>Çizelge 4.16:</b> KMS-20 hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı MyD88 gen ifade düzeylerine etkisi .....           | 74 |
| <b>Çizelge 4.17:</b> KMS-28BM hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı MyD88 gen ifade düzeylerine etkisi .....         | 77 |

## SİMGELER DİZİNİ

|                                                        |                                      |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| $\alpha$                                               | Alfa                                 |
| $\beta$                                                | Beta                                 |
| $\delta$                                               | Delta                                |
| <b>dL</b>                                              | Desilitre                            |
| $\epsilon$                                             | Epsilon                              |
| $\gamma$                                               | Gama                                 |
| <b>g</b>                                               | Gram                                 |
| $\kappa$                                               | Kappa                                |
| <b>L</b>                                               | Litre                                |
| $\mu\text{g}$                                          | Mikrogram                            |
| $\mu\text{L}$                                          | Mikrolitre                           |
| <b>mL</b>                                              | Mililitre                            |
| <b>mg</b>                                              | Miligram                             |
| <b>nM</b>                                              | Nanomolar                            |
| $^{\circ}\text{C}$                                     | Santigrat derece                     |
| <b>cm<sup>2</sup></b>                                  | Santimetrekare                       |
| <b>U</b>                                               | Ünit                                 |
| <b>2<sup>-<math>\Delta\Delta\text{CT}</math></sup></b> | Gen ifade düzeyindeki katlık değişim |

## KISALTMALAR DİZİNİ

|                |                                                                 |
|----------------|-----------------------------------------------------------------|
| <b>ALL</b>     | Akut lenfoblastik lösemi                                        |
| <b>AP-1</b>    | Aktivatör protein 1                                             |
| <b>ASCT</b>    | Otolog kök hücre transplantasyonu                               |
| <b>BLIMP-1</b> | B lenfosit matürasyon protein 1                                 |
| <b>BMSC</b>    | Kemik iliği stromal hücresi                                     |
| <b>C</b>       | Sabit Bölge                                                     |
| <b>CD40</b>    | Farklılaşma kümesi 40                                           |
| <b>cDNA</b>    | Komplementer deoksiribonükleik asit                             |
| <b>CDR</b>     | Çok değişken bölge                                              |
| <b>CLL</b>     | Kronik lenfoblastik lösemi                                      |
| <b>Cp</b>      | Crossing point                                                  |
| <b>CpG ODN</b> | CpG oligodeoksinükleotid                                        |
| <b>CRAB</b>    | Kalsiyum(C), Renal disfonksiyon (R), Anemi(A), Kemik Lezyonu(B) |
| <b>Ct</b>      | Eşik devri                                                      |
| <b>CXCR4</b>   | C-X-C kemokin reseptör tip 4                                    |
| <b>DAMP</b>    | Hasarla ilişkili moleküler kalıplar                             |
| <b>DC</b>      | Dentritik hücre                                                 |
| <b>DMSO</b>    | Dimetil sülfoksit                                               |
| <b>dNTP</b>    | Deoksinükleotid                                                 |
| <b>dsRNA</b>   | Çift sarmallı RNA                                               |
| <b>ECM</b>     | Hücre dışı matriks                                              |
| <b>EDTA</b>    | Etilendiamin tetraasetik asit                                   |
| <b>EMT</b>     | Epitelyum mezenkimal geçiş                                      |
| <b>Fab</b>     | Antijen bağlayan bölge                                          |
| <b>FADD</b>    | Fas ilişkili ölüm proteini                                      |
| <b>FBS</b>     | Fetal sığır serum                                               |
| <b>Fc</b>      | Kristalize bölge                                                |
| <b>FDA</b>     | Amerika Gıda ve İlaç Dairesi                                    |
| <b>FGF</b>     | Fibroblast büyüme faktör                                        |
| <b>FLC</b>     | Serbest hafif zincir                                            |

|              |                                                       |
|--------------|-------------------------------------------------------|
| <b>Gp96</b>  | Glikoprotein 96                                       |
| <b>H</b>     | Ağır zincir                                           |
| <b>HMCL</b>  | İnsan myeloma h¼cre hatları                           |
| <b>HMGB1</b> | Y¼ksek molilite grup kutu 1 proteini                  |
| <b>HSP</b>   | Isı Şok Proteini                                      |
| <b>IFR3</b>  | İnterferon d¼zenleyici fakt¼r 3                       |
| <b>IGF-1</b> | İns¼lin benzeri b¼y¼me fakt¼r¼-1                      |
| <b>IgG</b>   | İmmunoglob¼lin G                                      |
| <b>IKK</b>   | IκB kinaz                                             |
| <b>IL-6</b>  | İnterl¼kin 6                                          |
| <b>IRAK</b>  | IL-1 resept¼rle ilişkili kinaz                        |
| <b>IκB</b>   | İnhibit¼r kappa B                                     |
| <b>JNK</b>   | c-Jun N-Terminal kinaz                                |
| <b>L</b>     | Hafif zincir                                          |
| <b>LPS</b>   | Lipopolisakkarit                                      |
| <b>LTA</b>   | Lipoteikoik asit                                      |
| <b>M</b>     | Monoklonal protein, Monoklonal imm¼noglob¼lin         |
| <b>MALP2</b> | Makrofaj aktive eden lipoprotein 2                    |
| <b>MAPK</b>  | Mitojenle aktive edilmiş protein kinaz                |
| <b>MD</b>    | Myeloid farklılaşma fakt¼r¼ 2                         |
| <b>MDR</b>   | Çoklu ilaÇ direnci                                    |
| <b>MGUS</b>  | Sebebi bilinmeyen monoklonal gammopoti                |
| <b>MM</b>    | Multiple myeloma                                      |
| <b>MyD88</b> | Myeloid farklılaşma proteini 88                       |
| <b>NEMO</b>  | NFκB esansiyel mod¼lat¼r                              |
| <b>NF-κB</b> | N¼kleer Fakt¼r Kappa B                                |
| <b>NIK</b>   | NFκB ind¼kleyen kinaz                                 |
| <b>NK</b>    | Doğal katil h¼cre                                     |
| <b>ODN</b>   | Oligodeoksin¼kleotid                                  |
| <b>PAMP</b>  | Patojenle ilişkili molek¼ler kalıplar                 |
| <b>PBS</b>   | Dulbecco's phosphate buffered saline (fosfot tamponu) |
| <b>P-gp</b>  | P glikoprotein                                        |
| <b>PIK3</b>  | Fosfatidil inozitol 3 kinaz                           |
| <b>PKCα</b>  | Protein kinaz C alfa                                  |
| <b>PLM</b>   | Periferal monon¼kleer l¼kosit                         |

|                                 |                                                                             |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| <b>PMSB7</b>                    | Tripsin benzeri aktivite                                                    |
| <b>PRR</b>                      | Kalıp tanıma molekülleri                                                    |
| <b>PSMB5</b>                    | Kimotripsin benzeri aktivite                                                |
| <b>PSMB6</b>                    | Kaspaz benzeri aktivite                                                     |
| <b>qRT-PCR</b>                  | Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu                       |
| <b>Rd</b>                       | Lenalidomide-düşük doz dexamethasone                                        |
| <b>RHD</b>                      | Rel homoloji bölgesi                                                        |
| <b>RI</b>                       | Dirençlilik indeksi                                                         |
| <b>RT-PCR</b>                   | Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu                                  |
| <b>SDF-1<math>\alpha</math></b> | Stromal kaynaklı faktör 1 alfa                                              |
| <b>SMM</b>                      | Smoldering myeloma                                                          |
| <b>SPEP</b>                     | Serum Protein Elektroforezi                                                 |
| <b>ssRNA</b>                    | Tek sarmallı RNA                                                            |
| <b>STAT</b>                     | Sinyal iletili ve transkripsiyon aktivatörü                                 |
| <b>TBE</b>                      | Tris-Borat-EDTA                                                             |
| <b>TBK1</b>                     | İnhibitör Kappa Kinaz Kompleksi                                             |
| <b>TGF- <math>\beta</math></b>  | Transforme edici büyüme faktörü $\beta$                                     |
| <b>Th</b>                       | Yardımcı T hücreleri                                                        |
| <b>TIR</b>                      | Toll benzeri IL-1 reseptör                                                  |
| <b>TIRAP</b>                    | Toll/IL-1 reseptör alan içeren adaptör protein                              |
| <b>TLR</b>                      | Toll like reseptörler                                                       |
| <b>TNFR</b>                     | Tümör nekroz faktör reseptör                                                |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b>  | Tümör nekroz faktör alfa                                                    |
| <b>TRAF6</b>                    | TNFR reseptör ilişkili faktör 6                                             |
| <b>TRAM</b>                     | TRIF ilişkili adaptör protein                                               |
| <b>Treg</b>                     | Düzenleyici T hücreleri                                                     |
| <b>TRIF</b>                     | Toll/ IL-1 reseptör alan içeren adaptör protein INF- $\alpha$ indükleyicisi |
| <b>UPEP</b>                     | İdrar Protein Elektroforezi                                                 |
| <b>UPS</b>                      | Ubikitin proteazom sistemi                                                  |
| <b>V</b>                        | Değişken Bölge                                                              |
| <b>VCD</b>                      | Bortezomib- cyclophosphamide- dexamethasone                                 |
| <b>VEGF</b>                     | Vasküler endotelial büyüme faktör                                           |
| <b>VH</b>                       | Değişken ağır zincir                                                        |
| <b>VL</b>                       | Değişken hafif zincir                                                       |
| <b>B2MG</b>                     | $\beta$ 2 Mikroglobülin                                                     |

## 1. GİRİŞ

Multiple myeloma (MM) kemik iliğindeki plazma hücrelerinin anormal proliferasyonu ve invazyonu ile karakterize edilen hematolojik bir kanserdir. MM, kronik lenfositik lösemiden sonra ikinci en yaygın hematolojik kanser olup, son yıllarda insidansında da artış gözlenmektedir [1,2]. MM bir ileri yaş hastalığı olup genellikle 67-70 yaş aralığında görülmektedir [3]. Hastalığın en yaygın semptomları halsizlik ve kemik ağrısıdır. Osteolitik kemik lezyonları, kemik iliğinde normalin üstünde klonal plazma hücre sayısı ve buna ek olarak kan ve idrarda monoklonal proteinlerin varlığı bu patolojiyi tanımlamakta kullanılır [2, 3]. MM’da, monoklonal plazma hücreleri anormol olarak çok miktarda M protein de denilen, monoklonal immünoglobülin salgıladıkları için kan dolaşımındaki normal immünoglobülin miktarı azalır. Sonuçta MM hastaları enfeksiyona veya inflamasyona duyarlı hale gelir ki, bu durum hastalığın tedavi olma şansını zorlaştırır. Şu andaki mevcut tedaviler sadece geçici cevaplar oluşturduğu için MM pratikte tedavi edilemez [2]. Son yıllarda, kronik enfeksiyon ve inflamasyonun MM gelişim riskini arttırdığı, ayrıca hastalığın daha da ilerlemesine neden olabileceği ileri sürülmektedir [1,2].

Gerçekte, kronik enfeksiyon ve inflamasyonun kanserle olan ilişkisi birçok araştırmacı tarafından uzunca süredir vurgulanmaktadır. İnflamasyonlu bireylerin kansere yakalanma riskinin arttığı birçok çalışma ile rapor edilmiştir. Örneğin, enfeksiyonlu bağırsak hastalarının kolon kanserine yakalanma riskinin yüksek olduğu; *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun gastrik kanser riskini arttırdığı; kronik viral hepatitin karaciğer kanser riskini arttırdığı; *Epstein-Bar* virusunun Burkitt lenfoma riskini arttırdığı gibi birçok örnek verilebilir. Bu veriler, kronik inflamasyonun tümör oluşum riskini arttırdığını ve tümörün ilerlemesini tetiklediğini doğrular [4,5].

Son yıllarda, doğal ve adaptif immün cevabın ana elemanlarından olan Toll like reseptörlerin (TLR), inflamasyon ile kanser gelişimi arasındaki bağlantıyı sağladığı gösterilmiştir [6,7]. TLR’lerin uyarılamasıyla başlayan bu ilişki, tümör

mikroçevresindeki proinflatuar sitokinlerin indüksiyonu, kanser hücrelerindeki adhezyon melok llerinin upregülasyonu ve migrasyonu ile ilişkilendirilir [6]. TLR'ler enfeksiyon, doku hasarı ya da inflamasyon durumunda uyarılan transmembran yapısında reseptörlerdir. TLR'ler organizmanın hem doğal hem de adaptif immün cevabını uyarırlar. İnsanda TLR ailesinin tanımlanmış 10  yesi (TLR1-10) mevcuttur. TLR 1, 2, 4, 5, 6, 10 tipleri hücre yüzeyinde, TLR 3, 7, 8, 9 sitoplazmada özellikle endozomlarda bulunur. TLR'ler ekzojen ligandlar (bakteriyel, viral ve fungal patojenler) yanında hücre hasarı sonucu salınan endojen ligandlarla da aktive olur. Ligandların TLR'lere ba lanması, MyD88 (myeloid differentiation primary response)-bağımlı ve MyD88-bağımsız olmak üzere iki ana sinyal yolağını uyarır. Bununla birlikte her iki sinyal yolağı da transkripsiyonel faktör NF B'nin aktivasyonuna neden olur. NF B ise proinflatuar sitokinler gibi hedef genlerin ifadesini indükleyerek hücrenin strese karşı cevabını sağlarken ayrıca proapoptotik ve antiapoptotik gen ifadelerindeki değişiklikler ile farklı fonksiyonel cevaplara neden olmaktadır. Bu nedenle, TLR'lerin NF B aktivasyonunu sağlayarak kanser ve inflamasyon arasındaki bağlantıda ana giriş yeri olduğu düşünülür [2, 4, 8].

TLR'lerin doğal immün sistem hücreleri dışında özellikle B hücre kanserleri ve MM'da ayrıca hematolojik olmayan birçok kanser tipinde ifade edildiği rapor edilmiştir. TLR'lerin hem MM hücre hatlarında hem de hasta örneklerinden izole edilmiş primer myeloma hücrelerinde, normal plazma hücrelerine göre daha yüksek düzeyde ifade olduğu gösterilmiştir. MM hücrelerindeki yüksek TLR ekspresyonlarının özellikle kemik iliği mikroçevresinde kaçınılmaz bir şekilde gözlenen tümörü indükleyen inflamatuvar sinyallere cevabın bir göstergesi olduğu iddia edilir [9-11].

Son yıllarda MM gelişiminde ve ilerlemesinde kemik iliği mikroçevresinin rolünü tanımlamaya yönelik çalışmalar, yeni tedavi stratejileri geliştirme potansiyeline sahip olduğu için gittikçe önem kazanmaktadır. Bu çalışmalardan elde edilen önemli bir bilgi ise, MM hücrelerinin kemik iliğindeki öncül hücrelerle ve ekstrasell lar matriksle olan otokrin veya parakrin ili isinin, tümörün büyümesine, proliferasyonuna, tümörün immün sistemden kaçışına ve tümörün kemoterapötik ajanların apoptotik etkisine karşı direnç kazanmasına neden olabileceğidir [12,13, 6].

Gerçektende, insan MM hücre hatları ve primer myeloma hücrelerindeki TLR'lerin uygun ligandlarla uyarılması sonrasında, bazı TLR'lerin NF B ve MAPK

aktivasyonu ile ilişkili olarak, artan proliferasyon ve sağ kalıma neden olduğu ayrıca ilaçla indüklenmiş apoptozise direncin geliştiği çok açık gözlenen sonuçlardandır. Bununla birlikte farklı TLR'lerin farklı biyolojik sonuçlara neden olduğu bilinir. Örneğin bazı insan myeloma hücre hatlarında TLR3 uyarımından sonra apoptotik etki gözlenmiştir. Ayrıca kansere karşı immün sistemi baskılayan B7 protein ailesinde artış gözlenmiştir. Buna ek olarak, myeloma hücreleri ile yapılan neredeyse tüm çalışmalarda, TLR uyarımından sonra özellikle bu hücreler için önemli bir büyüme faktörü olan IL-6'yı da içeren proinflamatuvar sitokinlerin salgılandığı rapor edilmiştir [14, 11].

MM tedavi edilemeyen bir hastalık olup, günümüzdeki en etkin tedavi yollarından birisi bortezomibin yer aldığı kemoterapötik rejimin uygulanmasıdır. Bortezomib dipeptit boronik asit türevi olan bir proteazom inhibitörüdür. Bortezomibin MM tedavisinde kullanılabilirliği 2003 ve 2008 yıllarında FDA tarafından onaylanmıştır [15]. Bortezomib kullanımı MM tedavisinde olağanüstü yanıtlara neden olmuş ve hastaların hayatta kalmasını 3 yıldan 6 yıla uzattığı rapor edilmiştir [17]. Ancak hastaların birçoğunda bir süre sonra bu kemoterapik ajana karşı direncin geliştiği gözlenmiştir. Bu durum tedavinin etkinliğini ciddi bir şekilde düşürmektedir.

Bugün doğrudan ya da dolaylı olarak ilaç dirençliliğinde rol alan birçok mekanizma rapor edilmiştir. Bunlar; azalan ilaç alımı, artan ilaç atımı, ilaç inaktivasyonu, hedef ilacın değişimi, DNA hasarlarının onarımı, hücre ölümünün inhibisyonu, epitelyum-mezankimal geçiş (EMT) ve epigenetik değişiklikler gibi mekanizmalardır. Bu mekanizmalar birçok araştırmacı tarafından çalışmasına karşın, son yıllarda MM mikroçevresinin ve proinflamatuvar sitokinlerin özellikle TLR-NFκB sinyal iletimiyle MM gelişiminde ve kemoterapiye karşı gelişen ilaç dirençliliğinde rol alabileceği ileri sürülmüştür. Şu ana kadar yapılan çalışmalarda MM hücre hatlarında TLR ifadesinin olduğu saptanmasına karşın bortezomibe karşı direncin geliştiği hastalarda ve hücre hatlarında TLR ifade düzeyleri saptanmamıştır.

Bu tez çalışması ile bortezomibe dirençli ve hassas MM hücre hatlarındaki TLR'lerinin ifade düzeylerindeki farklılıklar saptanarak, bortezomibe karşı gelişen direnç mekanizmasında TLR'lerin rolü araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar MM'da TLR temelli yeni tedavilerin geliştirilebilmesi için ön çalışma niteliğindedir.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1 Multiple myeloma (MM)

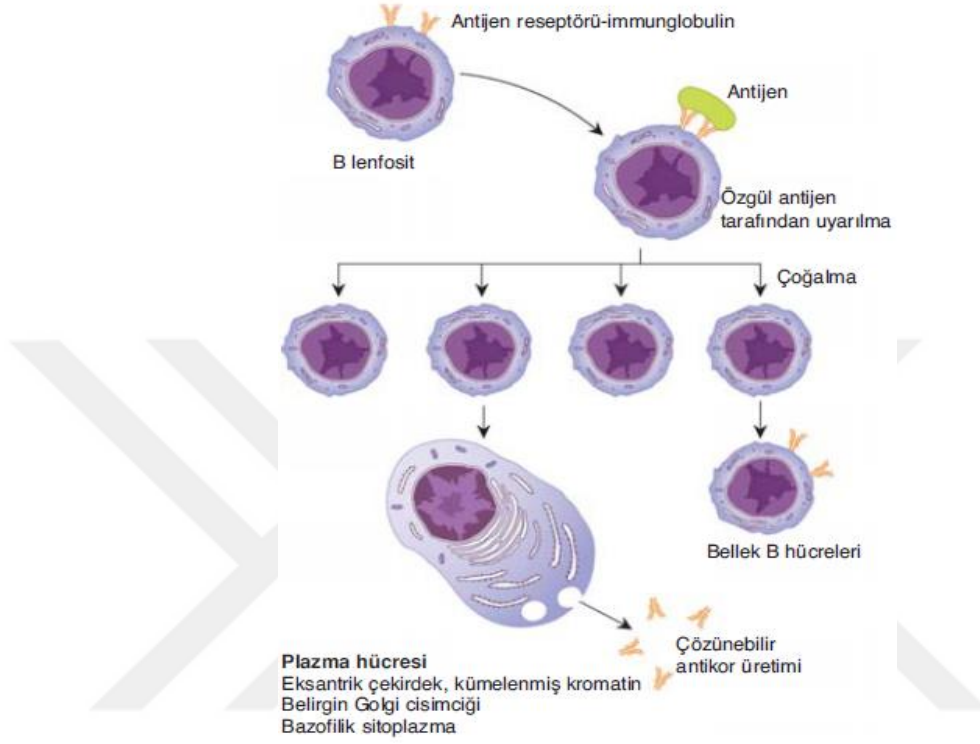
Multiple myeloma (MM), anormal immünoglobülin (Ig) olarak da bilinen homojen monoklonal protein (M) üretmekten sorumlu, kemik iliğindeki plazma hücrelerinin tek bir klonunun proliferasyonu ve invazyonu ile karakterize edilen bir kanserdir [2, 19].

Plazma hücreleri, kemik iliğindeki lenfoid kök hücreden köken alarak farklılaşan B hücrelerinden gelişir. Kemik iliğindeki öncül B hücreleri (Prekürsör B hücreleri), antijenik uyarılardan bağımsız bir gelişme göstererek preimmünoglobülin repertuarını oluşturacak şekilde olgun naif B hücrelerine dönüşür [20]. Olgun naif B hücreleri spesifik antijen tarafından uyarıldıktan sonra, farklılaşmaya başlayarak uzun ömürlü B hücrelerini ve plazma hücrelerini meydana getirirler (Şekil 2.1). Plazma hücreleri tek bir antikor proteinini üretmeye odaklıdır. Farklı morfolojileri sayesinde kemik iliğinde kolaylıkla tespit edilebilirler. Plazma hücreleri normalde bölünme yeteneğine sahip değildir ve olasılıkla birkaç haftayı aşmayan nispeten sınırlı bir yaşam süreleri vardır [21]. Bu nedenle, bir antikorun normal üretiminin sürdürülebilmesi için programlanmış B hücresi öncüllerinden yeni plazma hücrelerinin oluşturulması gerekir. Plazma hücresi malignitelerinin gelişimi apoptoza direnç ile belirir ve plazmada M komponenti (monoklonal immünoglobülin veya M-proteini olarak da adlandırılırlar) olarak ortaya çıkan, tek bir antikoru aşırı miktarlarda üreten bir plazma hücresi klonunun birikmesi ile gerçekleşir [21].

Her bir özel plazma hücresi sadece bir çeşit antikor salgılayabilir. Antijenik uyarıma karşı B hücrelerinin antikor yapan plazma hücrelerine farklılaşması sonucunda, milyonlarca farklı amino asit dizilimleri ile antijen bağlayıcı yerleri özgül olan milyonlarca farklı antikor oluşur.

İnsanda birbirinden farklı 5 tip immünoglobülin (IgM, IgG, IgD, IgE, IgA) tanımlanmıştır. İmmunoglobulinler  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  ve  $\alpha$  ağır zincirleri ile kappa ( $\kappa$ ) ve

lambda ( $\lambda$ ) hafif zincirleri taşırlar. Bir antikor molekülü birbirine eş 2 ağır (H) ve 2 hafif (L) zinciri olan ve her bir zinciri bir değişken (V) bir sabit (C) bölge içeren dört polipeptit zincirden oluşur (Şekil 2. 2). Dört polipeptid zinciri birbirine disülfid bağlarıyla bağlıdır [22].



**Şekil 2.1:** Plazma hücre farklılaşması ve morfolojisi [21].

Antikorların özgüllüğünü belirleyen ve antijen bağlayıcı yeri de içeren değişken bölge, Ig molekülünün amino (NH<sub>2</sub>) terminal kısmındadır. V bölgesinin oluşumuna ise hem ağır hem hafif zincir katılır. Ig V bölgesi bir çift VH (değişken ağır zincir segmenti) ve VL (değişken hafif zincir segmenti) kısmından oluşmuştur. Bu şekilde Ig molekülünün 2 antijen bağlanma yeri bulunur. Ig C bölgesi ise genel olarak CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, CH<sub>4</sub>, ile CL kısımlarından oluşur. İmmünoglobülinlerin değişken bölgesinde amino asit dizilimi o antikora özgüdür ve antikordan antikora değişir [20, 22].



olduğu için böbrekler tarafından filtrelenirler ve bu nedenle de idrarda bol miktarda saptanırlar [24].

Sonuçta MM vakalarında kan dolaşımındaki normal Ig miktarı azalırken anormal Ig miktarında artış gözlenir. Anormal Ig üretimine ek olarak apoptoza dirençli plazma hücrelerinin aşırı çoğalması kemik iliğinde normal kan hücrelerinin üretiminde de bozulmaya neden olur. Bu durum MM hastalarını enfeksiyona duyarlı hale getirirken aynı zamanda kemik lezyonlarının oluşmasına da neden olur [25].

## **2.2 MM Tanısı**

MM genel olarak ileri evreye kadar belirti vermeyen bir hastalıktır. Bu nedenle erken teşhis etmek zordur. Myelom teşhisi, klinik, morfolojik, immünolojik ve radyografik bilgilerin kombinasyonu ile yapılır [26].

Hastalığın en yaygın semptomları halsizlik ve kemik ağrısıdır. Osteolitik kemik lezyonları hastalığın karakteristik özelliğidir. Hastaların %25'inde hiperkalsemi (yüksek kalsiyum düzeyi), %50'sinde ise yüksek serum kreatin düzeyi gözlenir. MM tanısı, kemik iliğinde ve/veya biyopsi örneği plazmositomada %10 veya daha fazla klonal plazma hücrelerinin varlığını ve buna ek olarak serum ve/veya idrarda monoklonal (M) proteinin varlığını gerektirir. Ayrıca hiperkalsemi, böbrek yetmezliği, anemi ve kemik lezyonları ile birlikte görülen son organ hasarları MM patolojisi ile ilişkilidir. Kemik iliğinde %60 ve üstünde klonal plazma hücresi olan hastalar son organ hasarları görülmezsizin MM tanısı alırlar [27].

M proteinin varlığı MM tanısı için kritik bir öneme sahiptir. Bu protein hastaların %93'ünde serum protein elektroforezi (SPEP) ve immunofiksasyon yöntemleri ile saptanır. Ayrıca idrar protein elektroforezi (UPEP) ve idrar immunofiksasyonu ya da serum serbest hafif zincir (FLC) testleri MM tanısında kullanılırlar. Myeloma hastalarının %20'sinde M proteininde ağır zincir ekspresyonu yoktur. Bu hastalar hafif zincir myelomu olarak tanımlanır [27].

MM hastaları, serum  $\beta_2$ -mikroglobulin ve serum albumin düzeylerine bakılarak yüksek, orta ve standart riskli olmak üzere 3 farklı gruba ayrılır. Yüksek riskli myelomalar; 17p delesyonu, Ig ağır zincirinde (IgH) t(14;16) ya da t(14;20) translokasyonu, plazma hücre lösemisi, artan laktat dehidrogenaz düzeyi ve yüksek risk işareti taşıyan gen ifade profilleri gibi bir ya da birden fazla durumun olduğu

hasta grubudur. t(4;14) translokasyonu orta riskli myeloma grubu olarak kabul edilirken, diğer belirtiler standart riskli hasta grubunu işaret eder [27].

MM metastatik karsinoma, lenfoma, lösemi ve bağ dokusu bozuklukları gibi birçok hastalığa benzerlik gösterebilir, bu nedenle doğru tanının konulması önemlidir. MM hastaları sebebi bilinmeyen monoklonal gammopati ve Smoldering multiple myeloma monoklonal gammopati hastalarından ayırt edilmelidir. Bu durum MM sınıflandırmasını gerekli kılmıştır [28].

### 2.3 MM'nin Sınıflandırılması

MM'da tanı, sebebi bilinmeyen monoklonal gammopati (MGUS) ve Smoldering multiple myeloma (SMM)'dan ayırarak yapılır. Myeloma tanısı için serum ve/veya idrarda monoklonal protein varlığı, kemik iliğindeki klonal plazma hücresi oranı, plazmositom, anemi, litik kemik lezyonu veya osteoporoz, kemik iliği plazma hücresi işaretleme indeksi (plazma hücresi çoğalma ve bölünme hızı), böbrek yetersizliği ve hiperkalsemiden biri veya daha fazlasının olması gerekmektedir [29]. Myeloma 3 kategoride sınıflandırılabilir (Çizelge 2. 1).

**Sebebi bilinmeyen monoklonal gammopati (MGUS);** 50 yaşın üstündeki nüfusun % 3'ünden fazlasında görülen ve yılda %1'lik bir oranda MM'ya ilerleyen premalign ve genellikle klinik olarak tespit edilemeyen evredir [9, 30]. İlk aşamada, MGUS serumda 30 g/L'den az M proteini veya kemik iliğinde %10'dan az plazma hücresi ve CRAB kriterleri (yüksek kalsiyum düzeyi, böbrek yetmezliği, anemi ve osteolitik kemik lezyonları) ile karakterizedir [19].

**Asemptomatik myeloma (Smoldering multiple myeloma/SMM);** Hastalığın bir sonraki aşaması olan SMM, serum monoklonal protein 30g/L'den fazla ve/veya %10'dan daha fazla klonal kemik iliği plazma hücreleri ile karakterizedir ve organ hasarı yoktur. MM' dan önce ortaya çıktığı düşünülmektedir [17, 31, 32].

**Semptomatik myeloma;** Serum ve/veya idrarda monoklonal protein bulunması ile %10'dan daha fazla klonal kemik iliği plazma hücresi kanıtlarının olması ve son organ hasarı ile karakterize edilmektedir [19].

**Çizelge 2.1:** MGUS, SMM ve Semptomatik myeloma tanı kriterleri [32].

| Myeloma Tipi         | Tanı Kriterleri                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MGUS                 | Serum monoklonal protein <30g/L<br>Klonal kemik iliği hücresi <%10<br>Herhangi bir hastalık bulgusu ya da organ hasarı olmayacak                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Asemptomatik myeloma | Serum monoklonal protein > 30g/L<br>Klonal kemik iliği hücresi > %10<br>Herhangi bir hastalık bulgusu ya da organ hasarı olmayacak                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Semptomatik Myeloma  | Serum ve/veya idrarda monoklonal protein bulunması (bu kriter non-sekretuar MM için geçerli değil)<br>Klonal kemik iliği hücresi > %10<br>Aşağıdaki organ hastalıklarından (CRAB kriterlerinden) en az biri var <ul style="list-style-type: none"><li>➤ Kalsiyum yüksekliği &gt; 100g/L</li><li>➤ Böbrek fonksiyon bozukluğu-kreatinin &gt; 2mg/L</li><li>➤ Anemi- hemoglobin &gt; 100g/L</li><li>➤ Kemik hastalıkları (litik lezyonlar, osteoporez)</li></ul> |

## 2.4 MM' nın Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi

MM tüm kanserlerin yaklaşık %1'ini ve hematolojik malignitelerin %10'unu oluşturmaktadır [33]. 2013 yılında yaklaşık 22.350 yeni vakadan 10.710'nun ölümle sonuçlandığı bildirilmiştir. Hastalığın görüldüğü ortalama yaş yaklaşık 67-70 yıldır. Hastaların %37'si 65 yaşından küçük, %26'sı 65-74 yaş arasında ve %37'si 75 yaş ve üzerindedir [3, 9]. MM şu anda kronik lenfositik lösemiden sonra en sık görülen hematolojik kanser olup son zamanlarda insidansının arttığı rapor edilmiştir [2]. Günümüzde MM tedavi edilemeyen bir hastalıktır. Ancak geçtiğimiz yirmi yıl içinde daha etkili terapötik stratejilerin ortaya çıkması ve destekleyici tedavilerle ortalama hayatta kalma süresi 3 yıldan 6 yıla kadar uzatılmıştır [17].

MM'nin tam anlamıyla tedavi edilememesinin sebebi etiyolojisinin bilinmesinden kaynaklanır. Diğer malignitelerde olduğu gibi radyasyon ve toksikiteye maruz kalmanın bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir. Ayrıca geçirilmiş enfeksiyonlar, inflamasyonlar, otoimmün ve alerjik hastalıkların myelomaya neden olabileceği ileri sürülmüştür [34].

Son yıllarda, kemik iliği mikroçevresinin myeloma patogeneğinde ve ilerlemesinde kritik bir öneme sahip olduğu bildirilmiştir [26]. Neoplastik plazma hücrelerinin kemik iliği mikroçevresindeki sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri ve kemik iliği stromal hücreleri ile doğrudan etkileşiminin myeloma patofizyolojisini etkileyen temel bileşenler olduğu rapor edilmiştir [26].

## 2.5 MM Tedavisi

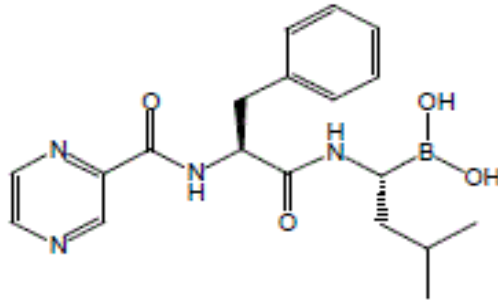
MM henüz tam anlamıyla tedavi edilemeyen hematolojik bir malignite olup yeni tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır [35]. Günümüzde MM tedavisi için halen en etkin tedavi yöntemi kemoterapötik rejimlerle sağlanmaktadır. MM tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçları beş farklı grup içinde yer alırlar. Bunlar; alkilleyici ajanlar (melphalon, cyclophosphamide); kortikosteroidler (prednisone, dexamethasone); proteasome inhibitörleri (bortezomib); immunomodulatorler (thalidomide, lenalidomide) ve antrasiklinler (doxorubicin, liposomal doxorubicin)'dir [27]. Yeni tanı almış hastalar, çeşitli prognostik faktörler temel alınarak standart, orta ve yüksek riskli myeloma olarak ayrılır ve bu prognoza göre tedavi planı gerçekleştirilir.

Standart riskli hastalarda ilk tedavi, lenalidomide-düşük doz dexamethasone (Rd) ya da bortezomib-cyclophosphamide-dexamethasone (VCD) rejimi ile yapılır. Bortezomib içeren rejimler orta ve yüksek riskli myelomalı hastalar için ilk tedavi olarak tercih edilir. Bortezomibi içeren kombine rejimin diğer rejimlere göre daha hızlı ve yüksek bir cevap oluşturduğu rapor edilmiştir [27]. İlk tedaviden 4 ay sonra, uygun olan hastalara otolog kök hücre transplantasyonu (ASCT) yapılabilir. ASCT'nin yapılabilirliği hastanın yaşı, performans durumu ve diğer şikâyetlerine bağlıdır. ASCT kesin bir tedavi sağlamamasına karşın, hastaların hayatta kalmasını 12 aya kadar uzatmıştır. Son yıllarda, thalidomide, lenalidomide ve bortezomib kombinasyonu ile elde edilen olumlu cevaplar, ASCT'in gerekliliğini tartışılır hale getirmiştir. Bununla birlikte, yeterli böbrek fonksiyonuna sahip ve özellikle 65 yaş altı hastalarda ASCT halen önemli bir tedavi opsiyonudur. ASCT'ye alternatif olarak allojenik transplantasyon da düşünülür, ancak bu durumda uygun donörün bulunma zorluğuna ek olarak graft-versus host hastalığından ölüm oranı da oldukça yüksektir. Hemen hemen tüm MM hastalarında eninde sonunda relapse gelişir. Relaps olan hastalarda, thalidomide, lenalidomide, bortezomib, alkilleyici ajanlar, antrasiklinler ve kortosteroidler tek başına ya da kombine olarak kullanılırlar [27].

## 2.6 Bortezomib

Bortezomib, 2003 yılında tekrarlayan/tedaviye yanıt vermeyen MM ve mantle hücreli lenfoma, 2008 yılında yeni teşhis edilen MM tedavisinde kullanımı ABD Gıda İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış bir proteazom inhibitörüdür. Bortezomibin tek başına ya da kombine halde kullanılması klinikte genel olarak olumlu yanıtlara neden olmuştur [15, 16, 36]. Anti-myeloma rejimlerinde bortezomib kullanımından sonra 5 yıllık sağ kalımın %33'den %50'ye kadar yükseldiği rapor edilmiştir [37].

Bortezomibin moleküler formülü  $C_{19}H_{25}BN_4O_4$  tür. Kimyasal adı [3-methyl-1-(3-phenyl-2-pyrazin-2-ylcar-bonylamino-propanoyl) amino-butyl] boranik asittir. Bir dipeptit boronik asit türevi olan bortezomib, 20S proteazomunun kimotripsin aktivitesinin geri dönüşümlü inhibe eder. Bortezomibin boronik asit kısmı, proteazomun  $\beta 5$  alt biriminin nükleofilik hidroksil yan zinciri ile bir kovalent bağ oluşturur [36, 38].



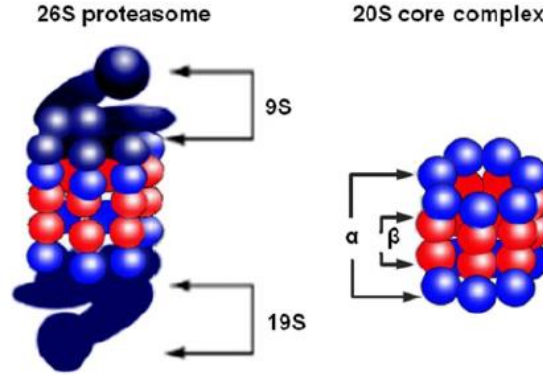
Şekil 2.3: Bortezomibin kimyasal yapısı [15].

### 2.6.1 Proteazom kompleksi

Proteazomlar ubiquinle işaretlenmiş proteinlerin yıkımından sorumlu proteaz kompleksleridir. Proteazomlar, sitoplazma ve çekirdekte lokalize olurlar [16]. Proteazom, 20S çekirdek kompleksi ve 19S düzenleyici kompleksi içeren bir 26S enzim kompleksidir (Şekil 2.4) [39]. Proteazomun 20S çekirdeği üç  $\beta$ -altbiriminin katalitik aktivitesini barındırır;  $\beta 5$  altbirimi (PSMB5, kimotripsin benzeri aktivite),  $\beta 1$  altbirimi (PSMB6, kaspaz benzeri aktivite) ve  $\beta 2$  altbirimi (PSMB7, tripsin benzeri aktivite) [40].

Ubikitinle işaretlenmiş proteinlerin yıkımını sağlayan ubiquitin proteazom sistemi (UPS), ökaryotik hücrelerde hatalı ya da yanlış katlanmış kısa ömürlü sitozolik ve

nükleer proteinlerin yıkımından sorumlu olduğu için protein hemostazisinde kritik bir öneme sahiptir. UPS hücrenin protein kalite kontrol mekanizması olarak çalıştığı, antijen işleme, sinyal iletimi, hücre çoğalması, hücrelerin hayatta kalması, hücre farklılaşması ve apoptozdan sorumlu olduğu rapor edilmiştir [36, 41, 42].



Şekil 2.4: Proteazom kompleksi [39].

Bortezomibin proteazomu inhibe etmesi birçok kanser hücresinde apoptozun uyarılmasına neden olmaktadır. Hem in vitro hem de çeşitli hayvan ksenograft modelleriyle yapılan çalışmalarda bortezomibin MM, prostat, pankreas, böbrek ve skuamöz hücre karsinoma dahil çok çeşitli kanser hücre hatlarında güçlü antitümör aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [36, 38].

Bortezomibin ayrıntılı etki mekanizması hala tam olarak anlaşılamamış olsa da, bazı önklilik çalışmalar bortezomib için olası anti-kanser mekanizmaları önermektedir. Mitsiades ve ark. (2002), insan MM hücrelerindeki proteazomları bortezomib ile inhibe ettiklerinde, proapoptotik gen kaskadında artan ifade düzeyi, prosurvival genlerde ise baskılanma olduğunu rapor etmişlerdir. Daha sonra yapılan birçok çalışmada bortezomibin MM tedavisindeki etkinliğinin NF $\kappa$ B sinyal yolağını bloke etmesine bağlı olduğu rapor edilmiştir [38].

### 2.6.2 Nükleer faktör kappa B (NF $\kappa$ B)

NF $\kappa$ B, sitoplazmada inhibitör bir protein olan I $\kappa$ B'ye bağlı ve inaktif formda bulunan heterodimerik bir transkripsiyon faktördür. NF $\kappa$ B aktivasyonuna neden olan bir çok uyarıcı, I $\kappa$ B'nin fosforilizasyonunu sağlayarak onun proteazomda degrade olmasına ve sonuçta sitoplazmada serbest kalan NF $\kappa$ B dimerinin çekirdeğe geçmesine ve hedef genlerin promotoruna bağlanarak transkripsiyonun başlamasına imkan sağlar. NF $\kappa$ B aktivasyonu oldukça sıkı kontrol altında tutulur. Normal

hücrelerde, sadece uygun uyarıcıdan sonra aktive olur ve hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır. NFκB proinflamatuvar sitokinler, T ve B hücre mitojenleri, bakteri ve lipopolisakkaritler, virüsler, viral proteinler, fiziksel ve kimyasal stresler gibi birçok uyarıcı tarafından aktive olur. Son yıllarda, NFκB'nin hücre proliferasyonu, apoptozis, anjiogenez, inflamasyon ve metastaz gibi birçok önemli olayda rol alan 500'den fazla genin regülasyonuna katıldığı rapor edilmiştir [43]. NFκB'nin özellikle hücre proliferasyonunda ve apoptozisin inhibisyonunda rol alması tümöreenezisle doğrudan ilişkilidir [44]. Bunu proapoptotik genleri baskılayarak, anti-apoptotik genleri indükleyerek, c-myc ve siklin D1 gibi hücre çoğalmasına neden olan birçok onkojenik sinyali indükleyerek gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca tümör hücrelerinin invazyon, metastaz ve anjiyogenez de rol alan genlerin transkripsiyonunu indüklediği rapor edilmiştir [44-46].

Son yıllarda yapılan çalışmalar, NFκB'nin hematolojik malignitelerin neredeyse tamamında ve bazı solid tümörlerde daimi olarak aktif olduğunu göstermiştir [47, 48]. Bu sonuç, NFκB'nin tümör oluşumunda önemli bir rol oynadığını ileri sürerken, kanser terapi için de umut verici bir terapötik hedef haline getirmektedir. İlginç olanı, kemoterapi ve radyoterapi uygulanmış kanser hücrelerinde (ki bu ajanlar NFκB aktivasyonuna neden olabilir) gözlenen apoptozise direnç mekanizmasında da NFκB'nin bu tümörojenik fonksiyonunun rol aldığı ileri sürülmüştür [49]. Gerçektende yapılan çalışmalarda, kemoterapiye duyarlı MM hücrelerindeki NFκB aktivitesinin, kemoterapiye dirençli MM hücrelerinden daha düşük olduğu gösterilmiştir. Ayrıca nükseden hastalardan elde edilen myeloma hücrelerinde NFκB düzeylerinin yüksekliği rapor edilmiştir [36]. Bu bulguların tümü NFκB'nin MM hücrelerinin büyümesi ve hayatta kalmasında anahtar düzenleyici olduğunu gösterirken, NFκB aktivasyonunu bloke etmeyi kanser terapi için umut verici bir hedef haline getirmiştir.

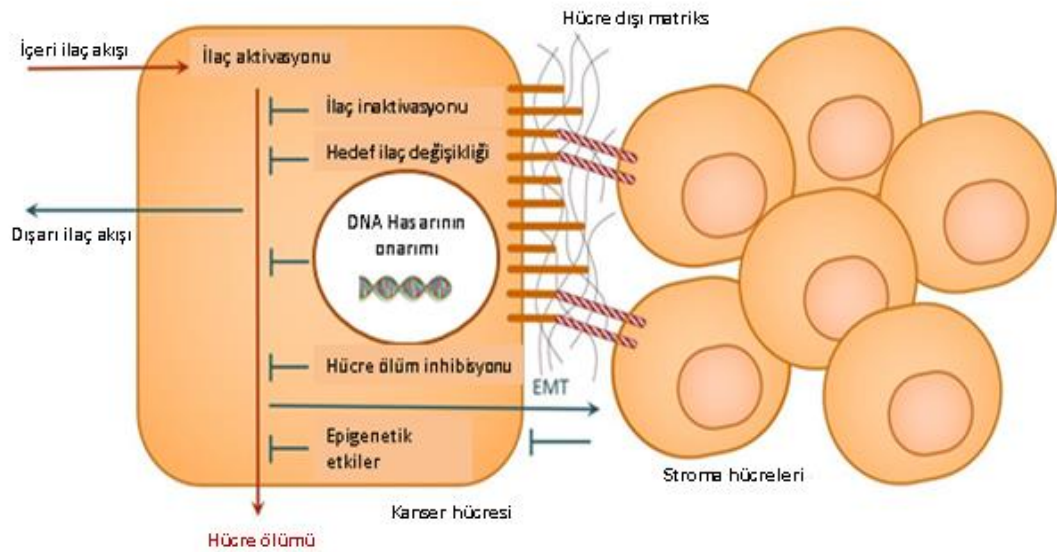
Bu hedefin ilk ürünlerinden birisi bortezomib olmuştur. Bortezomib NFκB sinyal yolağının spesifik bir inhibitörü olmamasına karşın, onun proteazomları inhibe etmesi, NFκB aktivasyonunda gerekli olan IκB proteinin proteazomda yıkımını bloke etmekte ve sonuçta NFκB aktivasyonunu baskılayarak antikanser aktiviteye neden olmaktadır. Bortezomib daha öncede söylendiği gibi MM tedavisinde geleneksel kemoterapilere göre çok olumlu ilerlemelere neden olan ve klinikte halen kullanılmakta olan bir ilaçtır. Ancak hastaların yaklaşık %60'ında gelişen direnç

mekanizmasından dolayı bortezomibe cevap vermediği bildirilmiştir. Bortezomib tedavisinin başlaması ile direnç oluşumu arasındaki ortalama süre yaklaşık bir yıldır [50].

## 2.7 Kanserde İlaç Direnç Mekanizması

Kemoterapi kanser tedavisinde en etkin ve yaygın tedavi yöntemidir. Ancak gerek tedavi süresince gerekse tedavi sonrasında hastalığın iyileşme sürecinde olumlu yanıt alınamaması önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Kanser tedavisinde başarıya ulaşmak için genellikle birden fazla anti-kanser ilaç uygulamasına gidilmekte, ancak sonradan kazanılan ya da tedavi öncesi kişide var olan ilaç direnci, kemoterapide başarıya ulaşmayı büyük ölçüde engellemektedir. Bu duruma çoklu ilaç direnci [multiple drug resistance (MDR)] denilmektedir. İlaç dozları artırıldığı zaman ise hastalarda yan etkiler açığa çıkmakta ve tedavi giderek daha da zorlaşmaktadır [51]. Bu nedenle tedavinin etkinliğini arttırmak için dirençlilik mekanizmalarını detaylı bir şekilde tanımlayarak, dirençliliği ortadan kaldıracak yeni tedavi protokolleri oluşturmak zorunlu hale gelmiştir.

Bugün doğrudan ya da dolaylı olarak ilaç dirençliliğinde rol alan birçok mekanizma rapor edilmiştir. Bunlar; azalan ilaç alımı, artan ilaç atımı, ilaç inaktivasyonu, hedef ilacın değişimi, DNA hasarlarının onarımı, hücre ölümünün inhibisyonu, epitelyum-mezankimal geçiş (EMT) ve epigenetik değişiklikler gibi mekanizmalardır [18].

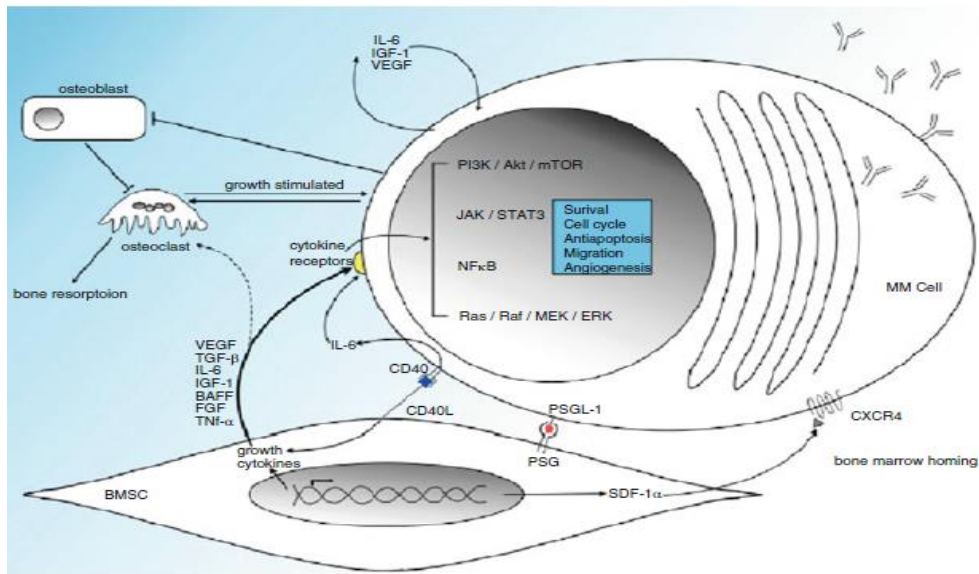


Şekil 2.5: Kanser hücrelerinde ilaca karşı gelişen direnç mekanizmaları [18].

### 2.7.1 MM'da bortezomibe karşı gelişen direnç mekanizması

MM tedavisinde bortezomib direncinin kesin mekanizmaları tam anlamıyla anlaşılmamıştır. Ancak myeloma modellerindeki araştırmalar doğuştan ya da kazanılmış bortezomib direncinin oluşması için potansiyel mekanizmalar sunmuştur. Bunlar arasında, kemik iliği mikroçevresiyle myeloma hücreleri arasındaki hücre-hücre etkileşimlerinin, bortezomibe karşı kazanılan direnç mekanizmasında en iyi incelenen ve yaygın kabul gören mekanizma olduğu görülmektedir. [52].

Bu görüşü destekleyen birçok çalışma vardır. Örneğin, ekstrasellüler matriks proteinlerinin, kemik iliğindeki neredeyse tüm hücre tiplerinin ve bu hücrelerden salınan büyüme faktörleri ve sitokinlerin ( IL-6, IGF-1, FGF, SDF-1 $\alpha$ , TNF-  $\alpha$ , TGF- $\beta$ , VEGF) MM hücrelerinin hayatta kalmasını desteklediği bildirmiştir [52]. Ayrıca MM ve kemik iliği stroma hücreleri (BMSC) arasındaki fiziksel etkileşimlerin, MM hücrelerinin proliferasyonu, göçü ve kemoterapötik ajana duyarlılığının azalmasına neden olan PI3K/AKT, STAT3 ve NF $\kappa$ B gibi çeşitli sinyal yollarının aktivasyonuna neden olduğu rapor edilmiştir [52]. Ayrıca IL-6 (İnterlökin 6) gibi sinyal iletiminde rol alan genler ve CD40 ve CXCR4 gibi adhezyon proteinlerinin kaybıyla sonuçlanan mutasyonların da MM ve BMSC'ler arasındaki etkileşimin bozulmasına neden olduğu ve bununla önemli ölçüde bortezomibe direnç gelişimini sağladığı bildirilmiştir (Şekil 2. 6) [52]. Bu sonuçların tümü, bortezomibe karşı gelişen dirençlilikte, tümörün ve onun mikroçevresinin kritik bir rol oynadığını destekler niteliktedir.



Şekil 2.6: Bortezomibe karşı gelişen direnç mekanizması [52].

Bortezomibe karşı gelişen dirençlilikteki en yaygın mekanizmalardan bir diğerinin de 20S proteazomun  $\beta$  altbirimindeki mutasyonlar olduğu düşünülür. Ayrıca konstitüf NF $\kappa$ B aktivitesinin de bortezomibe karşı dirençlikte rol aldığı birçok çalışma ile gösterilmiştir [53].

## 2.8 MM Mikroçevresi

MM, kemik iliğinde malign plazma hücrelerinin birikimi ile karakterize, tedavi edilemez bir B hücre malignitesidir. MM hücrelerinin proliferasyonu ve hayatta kalması kemik iliği mikroçevresindeki faktörlere bağlıdır. IL-6, tümör nekroz faktörü (TNF), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), IL-10, IL-13, IL-21 ve IL-15 dahil olmak üzere birçok sitokin in vitro koşullarda MM hücrelerinin çoğalmasına neden olduğu gösterilmiştir [54].

Myeloma esas olarak B hücre dizisinin bir bozukluğudur, ancak T hücre kısmında sıklıkla etkilenir. Bu kusur, CD4 hücrelerinin mutlak sayısının belirgin bir azalması ile meydana gelirken, CD8 lenfositlerinin sayısı normal kalır, bu da CD4/CD8 oranının düşmesine neden olur. Aslında, CD4, CD8 ve doğal katil (NK) T hücre alt gruplarındaki tümör spesifik T hücrelerinin kaybı, MGUS'dan MM'ye ilerleme için bir işarettir. Düzenleyici T hücreleri (Treg) ile yardımcı T (Th) hücreleri arasındaki denge, MM'da anti-tümör immünitinin sürdürülmesi için gereklidir. Treg'ler enfeksiyonlara ve tümör hücrelerine karşı immün tepkisinin modülasyonunda önemli bir koruyucu rol oynamaktadırlar [33].

Günümüzdeki kanıtlar MM gelişimi için antijenik uyarının kilit faktör olabileceğini düşündürmektedir. Normal plazma hücrelerinin aksine, insan myelom hücre hatları ve primer myelom hücreleri geniş bir yelpazede TLR'leri ifade eder. TLR'ler normalde B lenfositleri tarafından ifade edilir ve bu hücrelerin enfeksiyon ajanları ve PAMP'ları tanınması için gereklidir, bu da konak savunma tepkisini başlatır. Plazma hücreleri tarafından TLR'lerin anormal şekilde ekspresyonu, TLR'ye spesifik ligandlara yanıt vermelerini sağlayarak, enfeksiyona anormal veya sürekli bir tepki verir. Bu tepkilere kısmende olsa IL-6 üretimi aracılık etmektedir. IL-6, plazma hücreleri için önemli bir büyüme faktörüdür ve normal plazma hücreleriyle karşılaştırıldığında MGUS'da CD126'nın aşırı ekspresyonunu (IL-6 reseptör  $\alpha$ -zinciri) sağlar. Dolayısıyla, plazma hücrelerinde IL-6 reseptörlerinin anormal TLR ekspresyonu ve/veya aşırı ekspresyonu, enfeksiyona anormal tepki veren ve plazma

hücreleri için sürekli IL-6'ya bağımlı proliferatif tetikleyiciler oluşturan olayları başlatır. Özetle MGUS'dan MM geçişte, başka bir deyişle B hücrelerinin antijenik uyarım sonrası antikör salgılayan plazma hücrelerine geçişinde TLR ifadesinin kaybolmaması, sınırlı bölünme yeteneğine sahip olan plazma hücrelerinin sınırsız çoğalan ve antijenik uyarıma devamlı cevap veren malign plazma klonunun oluşmasına neden olur. [27].

Bu sonuçlar, tümör hücrelerinin immün yanıtları kendi menfaatlerine yönlendirmek için inflamasyonu kullandığını doğrular ve tümör hücrelerinin immün sistemin gözetiminden kaçmak için kendi mikroçevresi ile dinamik bir etkileşim içinde olduğunu gösterir [9].

## 2.9 Toll Like Reseptörler (TLR)

TLR'ler hem doğal hem de adaptif bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynayan tip I transmembran protein ailesidir [55]. İlk olarak 1991 yılında meyve sineği *Drosophila melanogaster*'da keşfedilmiştir. Mantarlara ve bakteriyel enfeksiyona karşı *Drosophila*'nın savunmasında Toll'un gerekli olduğu gösterilmiştir. Bağışıklık sisteminde önemli işlevlere sahip olan bu reseptöre, Toll genine benzerliğinden dolayı Toll adı verilmiştir [56-59]. İnsanlarda interlökin-1 reseptörün (IL-1R)'ün homoloğu olan bu moleküllere TLR'ler denilmektedir [56]. İlk kez 1998'de insanlarda olduğu anlaşılmış ve ilk protein homoloğu olarak TLR4 keşfedilmiştir [55]. Memelilerde onüç TLR tespit edilmiştir; bunların 10'u (TLR1-TLR10) insanlarda ifade edilirken 11, 12 ve 13'ün farelerde işlevsel olduğu tanımlanmıştır [9, 60, 61].

Evrimsel olarak korunan ve germ hattında kodlanan kalıp tanıma reseptörleri (PRR) ailesinden olan TLR, birçok hücre tipinde sentezlenir. Özellikle de makrofajlar, nötrofiller ve dendritik hücreler (DC) gibi doğuştan gelen immün sistem hücreleri tarafından ifade edilirler (Çizelge 2. 2) [22, 62, 63]. PRR'lerin aktivasyonundan kaynaklanan sinyaller mikroorganizmaların temizlenmesi ve homeostazinin düzenlenmesine ek olarak adaptif immün sistemin aktivasyonu için de kritik öneme sahiptir [7].

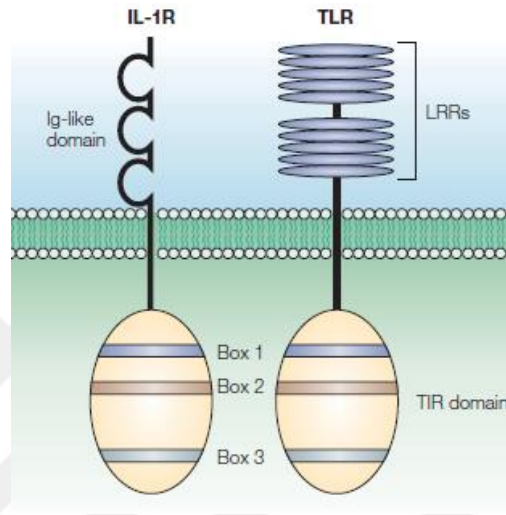
**Çizelge 2.2:** TLR'lerin immün sistem hücrelerinde dağılımı [55].

| <b>TLR</b>   | <b>İmmün sistem hücreleri</b>                                                  |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| <b>TLR1</b>  | DC'ler ve B hücreleri dahil birçok hücre türü                                  |
| <b>TLR2</b>  | PML'ler, DC'ler, monositler ve T hücreleri                                     |
| <b>TLR3</b>  | DC'ler, NK hücreleri ve T hücreleri                                            |
| <b>TLR4</b>  | Makrofajlar, DC'ler ve T hücreleri                                             |
| <b>TLR5</b>  | Monosit, DC, NK hücreleri ve T hücreleri                                       |
| <b>TLR6</b>  | B hücrelerinde ve DC'lerde yüksek ekspresyon; Düşük monosit ve NK hücrelerinde |
| <b>TLR7</b>  | B hücreleri, DC'ler, monositler ve T hücreleri                                 |
| <b>TLR8</b>  | Monositler, DC'ler; NK ve T hücrelerinde düşük                                 |
| <b>TLR9</b>  | DC'ler, B hücreleri, PML'ler, makrofajlar, NK hücreleri ve mikrogial hücreler  |
| <b>TLR10</b> | B hücreleri; DC'lerde düşük                                                    |

TLR'ler patojen ilişkili moleküler kalıp (PAMP)'lar vasıtasıyla doğal immün sistemi uyaran çok çeşitli patojenleri (bakteri, virüs, mantar ve parazitleri) algırlar. PAMP'lar hücre içi sinyalizasyon ile antimikrobiyal ve inflamatuvar aktivitelerde gerekli olan genlerin ekspresyonunu uyarır. Ayrıca TLR'lerin hücre ölümü ve doku hasarı ile ilişkili moleküler kalıp (DAMP)'ları tanıyarak konakçı savunmasında rol aldıkları iyi bilinmektedir. Birçok DAMP (fagositik S100 proteinleri, HMGB1, HPS) hasar gören hücrenin dışına salınan, fonksiyonel denatürasyona neden olan, hücre içi işlevleri tanımlanmış nükleer veya sitozolik proteinlerdir. Bazı durumlarda, immün sistemin sağlıklı hücreleri, enfeksiyonlara doğuştan gelen bir bağışıklık tepkisi olarak DAMP'lari üretmeye ve serbest bırakmaya teşvik edilir [64]. Ayrıca, TLR'lerin, hasara karşı inflamatuvar ve doku onarım yanıtlarını düzenleyerek doku homeostazını korumada önemli bir rolü vardır [9, 55, 65]. Buna ek olarak, TLR'lerin doğal ve adaptif immün yanıt oluşturarak inflamasyon ile kanser gelişimi arasındaki bağlantıyı sağladığı gösterilmiştir [7, 25, 66].

### 2.9.1 TLR'in yapısı

Hücre dışı alanda lösün açısından zengin tekrar motifleri [leucine-rich repeats (LRR)] ve sistein bakımından zengin tersdüz motifleri içeren tip I transmembran glikoprotein reseptörleridir. Sitoplazmik bölge, adaptör molekülleri MyD88, TIRAP/MAL, TRIF ve TIR (Toll-like /IL-1R) alanlarını kapsar [9, 60, 67]. Hücre dışı alan PAMP ve DAMP'ları tanır ve sitoplazmik alandaki Toll /IL-1 reseptörü (TIR) bağışıklık tepkisi için gerekli uygun kompleks sinyallerini başlatır [68, 69 ].



Şekil 2.7: TLR yapısı [70 ].

### 2.9.2 TLR'in lokalizasyonu

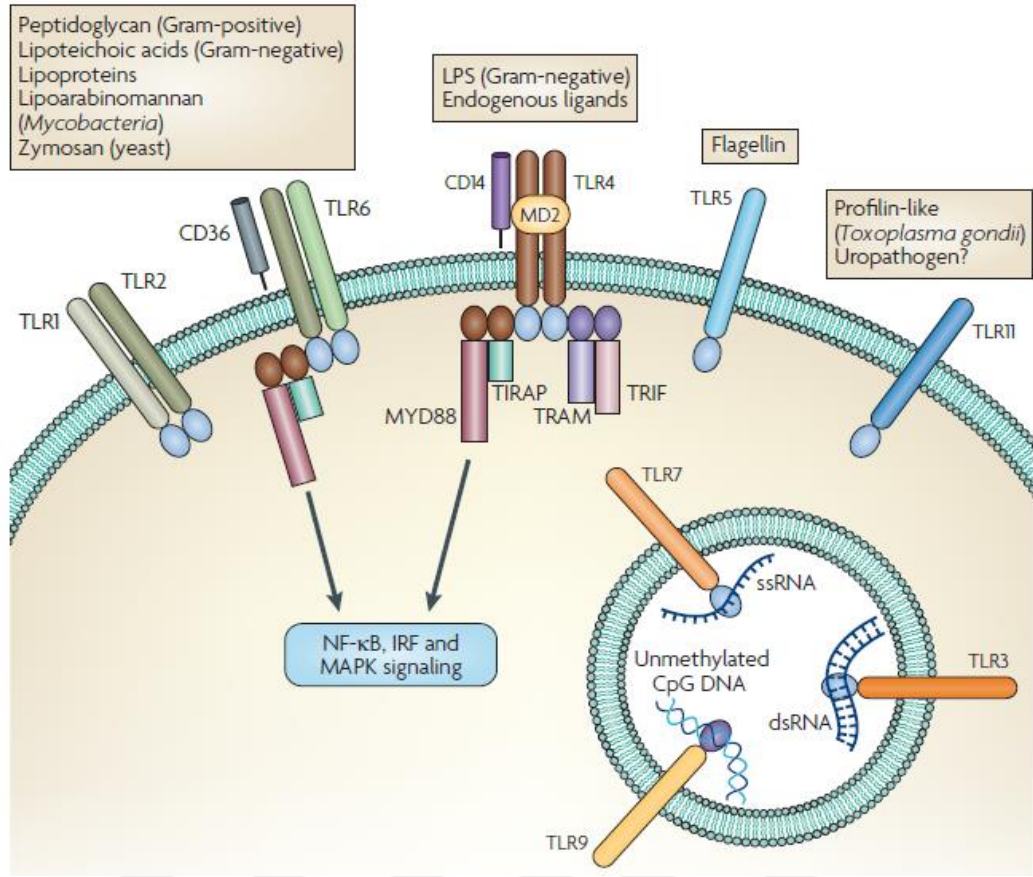
TLR'ler hücre yüzeyinde ve hücre içi membranlarda olduğu gibi farklı hücre bölümlerinde (lizozom ve endoplazmik retikulum) de bulunur. Lokalizasyonları patojenlerin tespitini kolaylaştırır. Lipidleri algılayan TLR1, 2, 4, 5, 6 reseptörleri hücre zarında bulunurken, tek sarmallı RNA (ssRNA) ve çift sarmallı RNA (dsRNA) ile uyarılan TLR7, 8, 3 reseptörleri ve CpG DNA ile uyarılan TLR9 reseptörleri hücre içinde membranla çevrili endozom veziküllerinde bulunur (Şekil 2.8) [68,71].

### 2.9.3 TLR'in ligandları

TLR'lerin PAMP ve DAMP'lar tarafından uyarılmasıyla birlikte inflamatuvar yanıt başlar ve homeostazinin korunması sağlanır. TLR1, 2, 4, 6, 10 lipopolisakkarit (LPS) ve lipoproteinler gibi lipid içeren moleküller ile etkileşime girer. TLR3, 5, 7, 8, 9 nükleik asitler gibi hidrofilik ligandlarla etkileşime girmektedir [67, 72]. Lipid aracılı etkileşimler kısmen TLR özgüllüğüne de katkıda bulunur [67].

TLR2, gram pozitif bakterileri, peptidoglikanı ve lipoteikoik asiti (LTA) algılar [73]. TLR2 reseptörü farklı mikrobik ürünleri tanımak için TLR1 veya TLR6 ile heterodimerler oluşturabilir. TLR2-TLR6 kompleksi, tercihen lipoprotein 2'yi aktive eden mikoplazma makrofajını, TLR2-TLR1 heterodimeri ise daha spesifik olarak bakteri lipoproteinlerini ve triaçil lipopeptitleri tanımaktadır [74, 75]. TLR4, gram-negatif bakterilerden LPS ile aktive edilirken LPS'nin tanınması için TLR4, ortak reseptör myeloid farklılaşma faktörü 2'nin (MD2) varlığını gerektirir [76]. TLR5 reseptörü ise bakteriyel flagellin tarafından uyarılır [77]. TLR3, 7 ve 8 çift veya tek sarmal RNA'ları bağlar ve viral özgüllük gösterirler [78, 79]. Diğer bir hücre içi TLR olan TLR9 reseptörü bakteriyel ve viral orijinli metillenmemiş CpG oligoDNA'ları algılar [80]. İnsanda işlevsel olan son reseptör TLR10'nun ise ligandı daha tanımlanmamıştır [60].

TLR2 ve TLR4 diğer TLR'lerden daha fazla DAMP'ı tanımaktadır. TLR2, ısı şok proteinlerini (HSP'ler), glikoprotein 96 (Gp96), hiyaluronik asit, hiyaluronan, yüksek mobilite grup kutusu 1 protein (HMGB1), versikan ve monosodyum ürat kristalini tanır. TLR4 HSP, Gp96, HMGB1, oksitlenmiş fosfolipid, heparin sülfat, fibrinojen, fibronektin, tenascin-C,  $\beta$ -defensin 2, hiyalüronik asit ve hiyalüronayı algılar. TLR3, TLR7 ve TLR8 reseptörleri ise konakçı RNA tarafından aktive edilmektedir. TLR9, ligand etkileşimini kolaylaştırmak için HMGB1 veya immünoglobülin kompleksi oluşumu gibi özel koşullar altında nekrotik hücrelerin konak DNA'sı tarafından aktive edilir (Çizelge 2. 3) [60].



Şekil 2.8: TLR lokalizasyonu ve ligandları [65].

Çizelge 2.3: TLR'in lokalizasyonu, ligandları ve sinyal adaptörü [7, 55, 60, 69].

| TLR  | Tür           | Lokalizasyon      | Ekzojen Ligandlar (PAMP)                                                         | Endojen Ligandlar (DAPM)                                                                                                                                         | Sinyal Adaptörü          |
|------|---------------|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| TLR1 | İnsan ve Fare | Hücre Membranı    | Bakteri: triaçil-lipopolisakkarit                                                | Bilinmiyor                                                                                                                                                       | MyD88                    |
| TLR2 | İnsan ve Fare | Hücre Membranı    | Bakteri: peptidoglikan, lipoproteinler, LTA, Mantar: zimosan                     | HSP60, HSP70, Gs96 fragmentler, hyalüronik asit, ECM, HMGB1, versikan                                                                                            | MyD88/ TIRAP             |
| TLR3 | İnsan ve Fare | Endozomal membran | Virüs: dsRNA                                                                     | mRNA                                                                                                                                                             | TRIF                     |
| TLR4 | İnsan ve Fare | Hücre Membranı    | Bakteri: LPS, Virüs: RSV fonksiyon protein, Protozoa: glikoinisitolfosfolipidler | HSP22, HSP60, HSP70, HSP72, Gp96, HMGB1, S100, Oksitlenmiş fosfolipidler, heparin sülfat, fibronektin, tenascin-C $\beta$ -defensin 2, versikan, hyalüronik asit | MyD88/ TIRAP/ TRAM/ TRIF |

**Çizelge 2.3 (devam) : TLR’in lokalizasyonu, ligandları ve sinyal adaptörü [7, 55, 60, 69].**

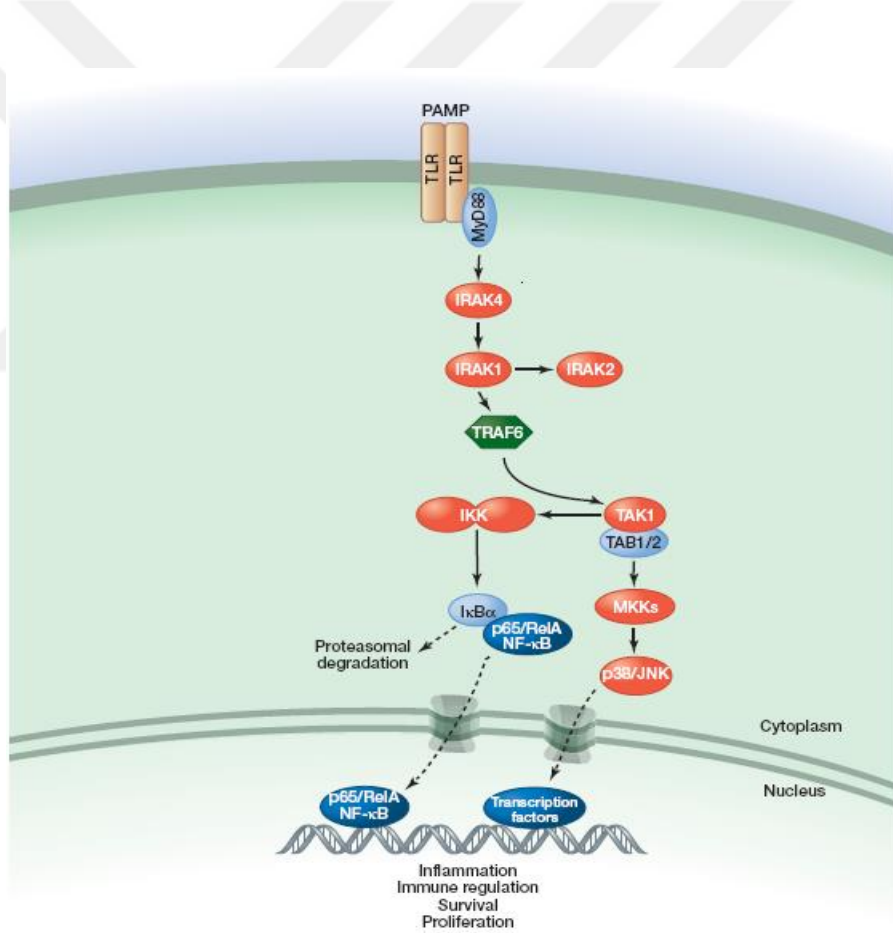
| TLR   | Tür    | Lokalizasyon      | Ekzojen Ligandlar (PAMP)                                                | Endojen Ligandlar (DAMP)                                          | Sinyal Adaptörü |
|-------|--------|-------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------|
| TLR5  | İ ve F | Hücre Membranı    | Bakteri: flagellin                                                      | Bilinmiyor                                                        | MyD88           |
| TLR6  | İ ve F | Hücre Membranı    | Diaçil lipoproteinler, lipoteikoit asit, zimosan                        | Oksitlenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein, Amyliod- beta, versican | MyD88/ TIRAP    |
| TLR7  | İ ve F | Endozomal membran | Virüs: ssRNA<br>Bakteri: ssRNA                                          | ssRNA (İmmün kompleks)                                            | MyD88           |
| TLR8  | İ ve F | Endozomal membran | Virüs ve Bakteri: ssRNA                                                 | ssRNA (İmmün kompleks)                                            | MyD88           |
| TLR9  | İ ve F | Endozomal membran | Virüs: CpG DNA<br>Bakteri: CpG DNA<br>Protozoa: CpG DNA, Haemozoin      | Kromotin IgG kompleks<br>HMGB                                     | MyD88           |
| TLR10 | İ      | Hücre Membranı    | Bilinmiyor                                                              | Bilinmiyor                                                        | Bilinmiyor      |
| TLR11 | F      | Endozomal membran | Protozoa: profilin benzeri moleküller (Toxoplasmosis gondii), Flagellin | Bilinmiyor                                                        | MyD88           |
| TLR12 | F      | Endozomal membran | Bilinmiyor                                                              | Bilinmiyor                                                        | Bilinmiyor      |
| TLR13 | F      | Endozomal membran | Bakteri: 23S Rna                                                        | Bilinmiyor                                                        | MyD88           |

#### 2.9.4 TLR’lerde sinyalizasyon

Doğal immün sistem myeloid hücreleri, TLR’lerle inflamatuvar sitokinlerin salınımını indükleyerek istila eden mikropları eninde sonunda ortadan kaldıran uyarıyı başlatır. Spesifik antijen ile bağışıklık tepkisi oluşturmak için lenfositleri harekete geçirir. [81]. Ligandların TLR’ye bağlanması, konakçı savunma reaksiyonlarını başlatan spesifik hücre içi sinyalizasyon basamaklarını aktive eder, ancak uygun olmayan şekilde düzenlenirse, hücresel yıkıma yol açar. Her hücre tipi, PAMP ve DAMP’ları tanıma ve bağışıklığa aracılık etmek için farklı fonksiyonlar gösteren belirli TLR’lere bağlanır (Şekil 2. 9) [82].

Ligandlar TLR'lere bağlandıktan sonra, MyD88'e bağımlı yolak ve MyD88'den bağımsız (TRIF) yolak olmak üzere iki yolağı tetikler. MyD88'e bağımlı yolakta NF- $\kappa$ B, mitojenle aktive edilmiş protein kinazlar (MAPK), p38 ve c-Jun N-terminal kinaz (JNK) aktive edilir. MyD88'den bağımsız yolakta hem NF $\kappa$ B hem de interferon düzenleyici faktör-3 (IRF3) aktive edilir [2].

Adaptör proteinler arasında MyD88, TRIF (TICAM1 olarak da bilinir), TIRAP (veya MAL) ve TICAM2 (veya TRAM veya TIRP) ile bağlantılıdır [11]. Adaptör moleküller bir araya gelerek kompleks yapar ve sinyal yolağının aktivasyonu gerçekleştirir [81]. MyD88, TLR3 hariç tüm TLR'ler tarafından kullanılan merkezi bir TLR adaptör proteini olup, inflammatuar sitokinlerin indüksiyonuyla sonuçlanan sinyalleri iletir [83].



Şekil 2.9: TLR sinyal yolağı [81].

#### 2.9.4.1 MyD88'e bağımlı sinyal yolağı

TLR2, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8 ve TLR9'un sinyal kaskadının aktivasyonu için MyD88 adaptör proteini gereklidir. TLR2 ve TLR4 reseptörlerinin aktivasyonu MyD88 bağımlı TIRAP aktivasyonu ile gerçekleşir [70].

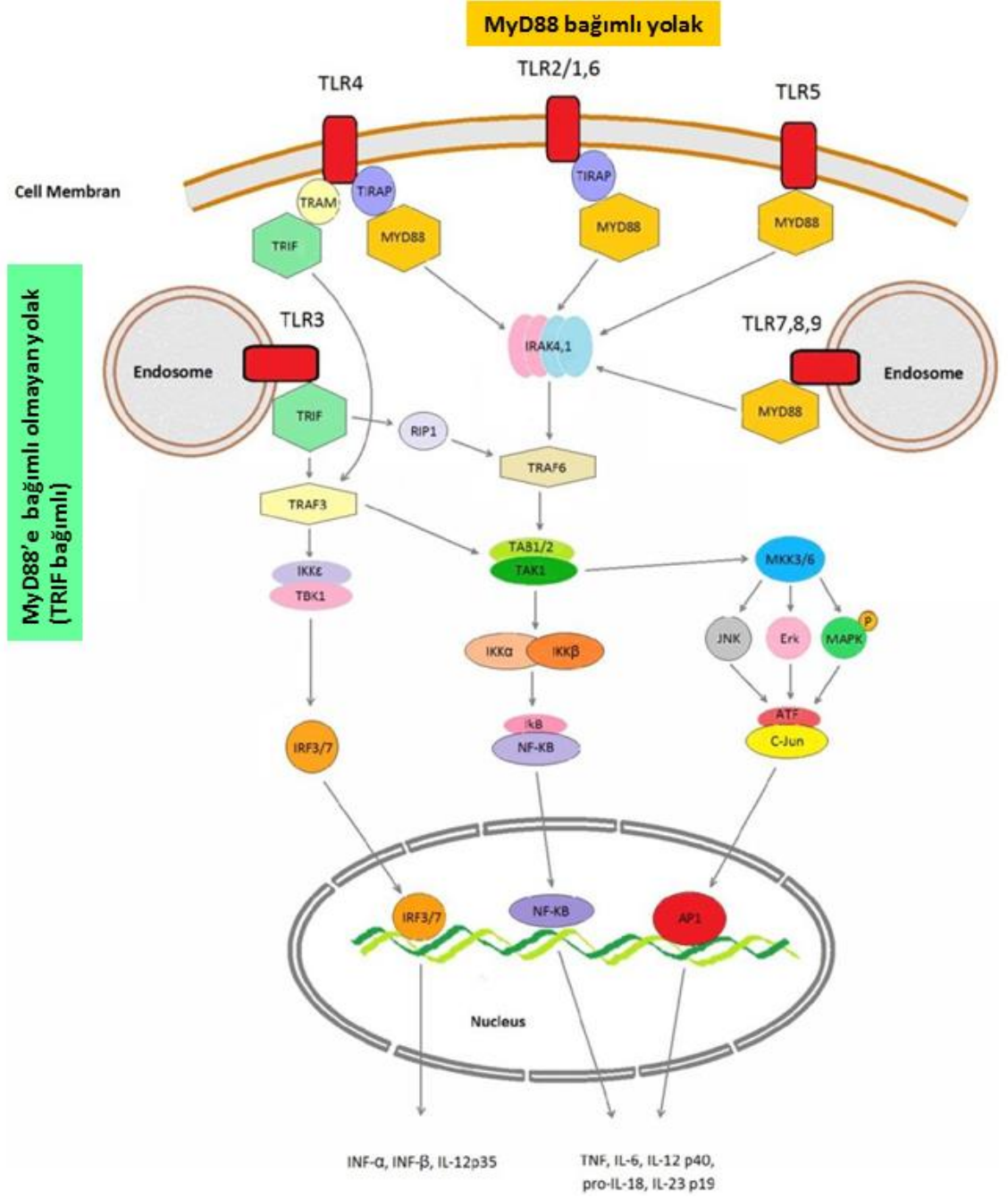
MyD88'e bağımlı yollarda, TLR tetiklemesi üzerine MyD88, IRAK ailesinin üyelerini ve TRAF6'yı işe alır. TRAF6, daha sonra fosforilasyona (P) ve IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  ve IKK $\gamma$  /NEMO, NF $\kappa$ B esas modülatörden oluşan IKK kompleksinin aktivasyonuna neden olan TAK1'i aktive eder [83, 84]. IKK kompleksinin aktivasyonu üzerine, I $\kappa$ B fosforile olur, böylece çekirdeğe translokasyon için NF $\kappa$ B salınır ve burada  $\kappa$ B bağlayıcı unsurları barındıran promotörler ile etkileşir. Buna ek olarak aktive edilmiş TAK1 ayrıca MAPK yolağını (JNK ve p38 gibi MAPK'ları) aktive eder, bu da fosforilasyon ve AP-1'in aktivasyonu ile sonuçlanır. NF $\kappa$ B ve AP-1, proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu indükleyerek inflamatuvar cevapları kontrol eder (Şekil 2.10) [83, 84].

#### **2.9.4.2 MyD88'den bağımsız (TRIF bağımlı) sinyal yolağı**

TLR3 ve TLR4 reseptörlerinin aktivasyonunu MyD88'den bağımsız olarak hareket eden TRIF'a bağlıdır. TRAM, MyD88'den bağımsız / TRIF'a bağlı olarak TLR4 sinyalleşmesine aracılık etmektedir [70]. TLR4 reseptörü, MyD88'den TRIF'a sinyali değiştirmek için hücre zarından endozomlara da geçebilir [83].

TLR'lerin tetiklemesi sonucunda TRIF'a bağımlı sinyal yolağı doğrudan TRAF6 ve/veya RIP1 bağlanarak TAK1'i aktive eder ve sinyal aktivasyonu gerçekleşir. Bu yolak NF $\kappa$ B ve MAPK aktivasyonuna aracılık eder [9, 84].

Ayrıca, TRIF'a bağımlı yolda, transkripsiyon faktörleri IRF3 ve IRF7'nin aktivasyonu için tip I IFN üretiminde önemli bir role sahip olan TBK'yı içeren başka bir kompleksi de aktive edebildiği gösterilmiştir [70]. TRIF IKK komplekslerinin, TBK ve IKK $\epsilon$ 'ların aktivasyonu için TRAF3'ü işe alır ve transkripsiyon faktör IRF3 ve IFN- $\beta$  transkripsiyonuna ve aktivasyonuna yol açar [85]. IKK kompleksi, inflamatuvar ve bağışıklık yanıtları sırasında bağımlı ve bağımsız NF $\kappa$ B sinyallerini yönetir (Şekil 2.10) [86].



**Şekil 2.10:** MyD88'e bağımlı ve bağımsız TLR sinyal yolağı [55].

TLR uyarılması ile NFκB aktivasyonu, doğuştan gelen ve adaptif immünite, çeşitli hücrelerin canlılığı ve proliferasyonu, hücrel stres tepkileri, anti-apoptoz ve kanser ilerlemesiyle ilgili birçok geni kontrol eder [62].

### 2.9.5 TLR uyarılması; proliferasyon ve hayatta kalma

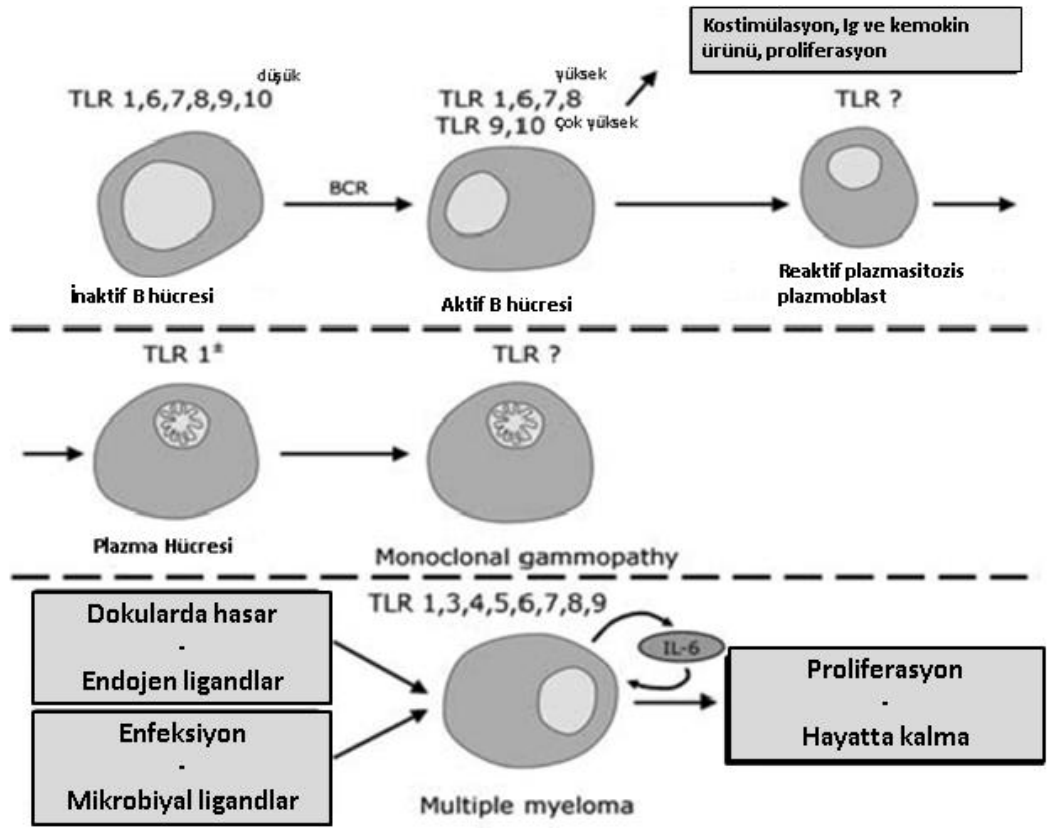
MM'nın TLR'in geniş bir repertuarını ifade ettiği ve TLR ligandlarının maling hücrelerin proliferasyonunu ve hayatta kalmasını teşvik ettiği bildirilmiştir [87]. MM hücreleri, hayatta kalma ve proliferasyon için kemik iliği mikroçevresindeki

faktörlere bağımlıdır [88-90]. MM hücrelerinin proliferasyonu IL-6, TNF, insülin benzeri IGF-1, IL-10, IL-21 ve IL-15 dahil olmak üzere birçok sitokin tarafından uyarılır [93, 94]. Bugün, patojenlerin farklı yapısal bileşenlerini tanıyan, insanda 10 tane TLR (TLR1-TLR10) ve RP105 (CD180) olarak adlandırılan bir TLR-homologu tanımlanmıştır [54].

B hücrelerinde çoğunlukla TLR1, 2, 6, 7, 9 ve 10, RP105 ve muhtemelen TLR4 ve 8 deki TLR aktivasyonunun, IL-6, IL-10, tip-I IFN gibi pro-inflamtuar sitokinler aracılığı ile hücrelerin proliferasyonuna ve hayatta kalmasına ayrıca plazma hücrelerinin farklılaşmasına neden olduğu iddia edilmiştir. TLR'ye spesifik ligandların MM hücre hatlarında kısmı bir otokrin IL-6 üretimi sağlayarak hücrelerin artan proliferasyonuna ve hayatta kalmasına (survival) neden olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.11) [9, 54]. Örneğin, TLR9 ligandı CpG oligodeoksinükleotid (ODN), myeloma hücrelerinde IL-6, IL-10, Ig'lerin salgılanmasının yanı sıra proliferasyonu, hayatta kalmayı ve farklılaşmayı artırırken, B hücrelerinde de çeşitli aktivasyon ve kostimülatör proteinlerin ekspresyonunun artmasına neden olmuştur. [54].

İnsan B ve plazma hücrelerindeki TLR'lerin ekspresyonunun ve aktivasyonunun, hücrenin gelişim ve farklılaşmasında ayrıca efektör fonksiyonlarda da rol oynadığı düşünülmektedir. MM hücrelerinde TLR aktivasyonuna karşı gelişen fonksiyonel yanıt, B hücrelerinde olduğu gibi kapsamlı olarak incelenmemiş olsa dahi, son yıllarda çok önemli bilgiler elde edilmeye başlanmıştır. Bugüne kadar yapılan bazı çalışmalarda, insan myeloma hücre hatları (HMCL) ve MM primer hücrelerinde uyarılan TLR'lerin proliferasyon artışına, hücrelerin hayatta kalmasına, sitokin ve kemokin üretimine, apoptoz indüksiyonu veya baskılanmasına, ilaç direncine ve bağışıklık sisteminden kaçış gibi heterojen etkilerle ilişkili olduğu ileri sürülmüştür [9]. Örneğin, MM hastalarından elde edilen myeloma örneklerinde, TLR'lerin sık ve fonksiyonel bir şekilde ifade edildiği gösterilerek, birkaç TLR ligandının [Pam3Cys, LPS, Flagellin, Makrofajı aktive eden lipopeptit-2 (MALP-2) ve R-848] hücre çoğalmasında önemli ölçüde arttırdığı rapor edilmiştir [54]. Bu çalışmada, Pam3Cys ve flagellinin, IL-6'ya kıyasla daha fazla çoğalmayı indüklediği gösterilmiştir. MALP-2, LPS ve R-848, IL-6 göre daha etkiliyken, poli I:C ve CpG'nin bazı hücre dizilerinde proliferasyon üzerinde olumsuz etkileri rapor edilmiştir. Ancak B hücreli lenfomalarda CpG ODN ile uyarılmış TLR sinyalizasyonun hem proliferasyon indüksiyonu hem de apoptoza neden olduğu gözlenmiştir [54]. Şaşırtıcı bir şekilde,

B-CLL (kronik lenfositik lösemi) hücrelerinin CpG ODN tedavisinde, aynı ligand normal B hücrelerinin sayısını arttırırken, malign hücrelerde de apoptozun artmasına neden olmuştur. Çoğu TLR ligandının B-CLL veya B lenfoma hücreleri üzerinde apoptotik ve immünsensitizing etkileri olduğu gösterilmiştir. MM hücreleri, CLL veya B lenfomalarındaki malign B hücreleriyle karşılaştırıldığında TLR aktivasyonu bakımından farklı davranmalarının nedeni açık değildir. Bu durum TLR'yi düzenleyen moleküler yolların MM hücrelerinde tam anlamıyla açıklığa kavuşturulmamış olmasından kaynaklanır [9].



Şekil 2.11: MM'da TLR'nin şematik görünümü [87].

## 2.10 TLR'ler ve Kanser

İnsan TLR'leri, dendritik hücreler, makrofajlar, monositler, doğal öldürücü hücreler, B hücreleri ve T hücreleri gibi çeşitli bağışıklık hücrelerinde eksprese edilir. Buna ek olarak, TLR'ler genellikle tümör hücrelerinde eksprese edilir. TLR ekspresyonunun akciğer, göğüs, karaciğer, kolorektal, prostat, pankreas, melanom, glioma ve özefagus kanserler dahil birçok tümörde yüksek düzeyde ifade edildiği rapor edilmiştir [95-99]. İnsanlarda mide, karaciğer, serviks ve ağız kanserlerine neden

olan bugün çok iyi tanımlanmış patojenler tanımlanmıştır. Bu patojenlere ait PAMP'lar TLR'lerin aktivasyonuna neden olabilirler [100-102]. Buna ek olarak, tümör hücrelerindeki TLR'ler, kemoterapi veya radyoterapi sonrasında ölmekte olan hücrelerden salınan HMGB1, S100 ve HSP gibi DAMP'lar tarafından da aktive olabilir [102]. Daha önce de belirtildiği gibi TLR'ler, PAMP ve DAMP'ları tanıma yeteneklerinden dolayı doğuştan gelen bağışıklığın temel elemanlarıdır. Alternatif çalışmalar, fonksiyonel TLR'lerin kanser hücreleri üzerinde de eksprese edildiğini, dolayısıyla tümörlerde TLR'lerin rol oynadığını ortaya koymuştur [103].

TLR'lerin ligandları, proinflamatuvar ve anti inflamatuvar mediatörlerin ve farklı sitokinlerin üretilmesine neden olan TLR sinyalizasyonuna yol açar. Tümör hücrelerinde kontrolsüz TLR sinyalizasyonu, proliferasyon ve bağışıklık sisteminden kaçışının gerekli olduğu bir mikroçevre sağlar. Dolayısıyla, TLR aktivasyonunun konakçı bağışıklığına ve tümörjenez potansiyel katkısı açısından çift uçlu bir kılıç görevi görebileceği akla yatkındır. Farklı koşullar altında pro-apoptotik ya da hayatta kalma etkisi gösterebilirler. Sonuç olarak, TLR'ler hem patojenlere hem de tümör hücrelerine karşı doğal ve adaptif bağışıklık tepkilerini tetikler ve doku onarımı ve rejenerasyon da dahil homeostaziyi düzenler [103-105].

## **2.11 TLR'lerin Anti-tümör Etkileri**

William Coley, 19.yüzyılın sonunda, gram pozitif ve negatif bakterilerden bazılarının antitümörde etkili terapötik ajanlar olabileceğini gördü [106]. Daha sonra Coley toksini olarak adlandırılan bakterial LPS'nin antitümör aktiviteye neden olduğu ve LPS'nin bu antitümör etkisinin TLR4'ü uyarması sonucunda olduğu keşfedildi. Bugün, TLR4'ün güçlü bir adaptif immün yanıt oluşmasında rol aldığı bilinmektedir. Günümüzde TLR4 agonistleri klinikte kanser aşılı için kullanılan adjuvanlardır ve TLR4 agonistleri ile sağlanan TLR4 aktivasyonun, kanser terapide kullanılabileceği bildirilmiştir [107].

Diğer bir reseptör olan TLR3, normal hücreler veya kanser hücrelerinde poli I:C gibi viral veya sentetik dsRNA ile aktive edilir. Yakın zamanda TLR3'ün pulmoner hücreler ve hepatositler de dahil olmak üzere bir dizi epitel hücresi tarafından ifade edildiği bildirilmiştir. İlginçtir ki, meme kanseri veya melanom gibi tümör hücreleri de TLR3'ü ifade ederler. TLR3'ün bu kanser hücrelerinde uyarılması apoptoz veya sitotoksik lenfositlerin tümör yerlerinde kemoatraksiyona neden olmuştur. Meme

kanseri hastalarında TLR3 ifadesinin dsRNA aracılığıyla sağlandığı ve kanser hücrelerinde antitümör etkiler için işlevsel olduğu bildirilmiştir [107].

Ayrıca, TLR5'in meme kanserlerinde yüksek oranda ifade edildiği ve meme kanseri hücrelerinin TLR5 sinyalizasyonuna fazla duyarlı olduğu gösterilmiştir [108]. İlginç olarak, meme kanseri hücrelerinde flagellin/TLR5 sinyalinin, hücre çoğalmasını ve tümör transformasyon özelliğini inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu bulgular, flagellinin ile gerçekleşen TLR5 aktivasyonunun insan göğüs kanseri tedavisi için yeni bir terapötik hedef olabileceğini ve doğuştan gelen güçlü antitümör aktiviteye aracılık edebileceğini göstermektedir [109].

Günümüzde en fazla çalışılan ve gelecek vaat eden TLR ligandı, beyin, lenfoma, deri, akciğer ve böbrek kanseri tedavisinde kullanılan CpG ODN'yi içeren TLR9 aktivatörleridir. Bu TLR9 agonistleri antikanser ilaçlarda kombine veya monoterapötik olarak kullanılırlar [65].

Tüm bu bulgular, TLR'lerin bağışıklık sistemini uyarılabildiğini ve bunun sonucunda aktif hale gelen bağışıklık sisteminin tümör antijenlerine karşı da duyarlı hale gelebildiğini göstermektedir [107]. Genel anlamda immunoterapilerin dendritik hücrelerin aktivasyonu ile antijen sunumunu, B ve T hücrelerinin antitümör yanıtlarını arttırabileceği bilinmektedir [110]. TLR'lerin kanserdeki ana fizyolojik rolü, kanser gelişimiyle ilişkili olan mikrobik patojenleri tanımak ve enfeksiyonu önlemektir [65]. Ancak TLR sinyalinin başlatılması bağışıklık sistemini harekete geçirdiği için, TLR aktivasyonu aynı zamanda kanser hücrelerine karşı da bir savunma mekanizmasının oluşmasına yol açmıştır [107]. Bu nedenle, TLR ligandlarının rolünü belirlemek için daha fazla araştırma yapmak, çağımızın sorunu olan kanserin tedavisi için elzem olabilir.

## **2.12 MM' da TLR Temelli Terapi**

MM hala tedavi edilemez bir hastalıktır ve uzun vadeli tümör regresyonu oluşturan ve hastalığı tamamen iyileştiren yeni yollara ihtiyaç vardır. Mevcut geleneksel MM terapileri, kortikoidler ile kombine sitotoksik ajanlar (özellikle alkilleyici ajan melfalan) ve daha yakın zamanda proteazom inhibitörü bortezomib kullanımını içermektedir. MM hastalar için sıklıkla kullanılan etkili bir tedavi, yüksek doz kemoterapi ve ardından otolog kök hücre naklidir. Malign kök hücrelerin kemoterapiye dirençli olduğu ve nüksettiği bilinmektedir [2]. Hawley S. ve

arkadaşları, MM'daki tümör yayan hücrelerin, kemoterapötik ajanlara direnç kazanmış kök hücre benzeri özelliklere sahip olduğunu kanıtlamıştır [111].

TLR'ye dayalı tedaviler myelomayı geleneksel tedavilere duyarlı hale getirebilir [112]. TLR2, 4, 5 ve 9 birçok tümör hücresinin yüzeyinde eksprese edilir ve ligandları doğrudan kanser hücreleri ile etkileşime girerek, tümörün ilerlemesini teşvik eder ve hücreleri kemoterapiye karşı daha savunmasız hale getirir. TLR sinyal yolağının agonistleri ve antagonistleri (TIR-8 aktivatörleri, IKK-2 inhibitörleri, non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlar, glukokortikoidler veya parthenolide) doğrudan veya dolaylı olarak tümör gelişimini inhibe edebilir [2].

Sitokin üretimini uyaran antiviral ajanlar olan imidazokinolinler TLR7/8 agonistleridir. Bir başka TLR7/8 agonisti olan IPH-3201'in kanser, enfeksiyöz ve otoimmün hastalıkları tedavi etmek için kullanılabileceği bildirilmiştir [113]. Hematolojik maligniteleri olan hastalarda TLR7 agonisti olan 852A (S-32865) ile yapılan araştırmalarda immün aktivasyonun (artmış NK ve T hücre aktivasyonu) arttığı gösterilmiştir [114]. TLR9 agonisti olan ODN-CpG'nin, myeloma hücre büyümesini inhibe ettiği, bortezomibe bağlı apoptozu arttırdığı ve T-hücresine bağlı antitümör yanıtı indüklediği rapor edilmiştir [65, 115]. Günümüzde, TLR9 agonistleri göğüs, kolon ve akciğer kanseri, melanoma ve glioblastoma tedavisindeki klinik araştırmalarda kullanılmıştır [65]. Bir TLR2/6 agonisti olan MALP-2, pankreas kanseri hastalarının yaşam sürelerini 9 aydan 17 aya çıkarmıştır [116].

Bununla birlikte, yukarıdaki örneklerin aksine, birçok tümör hücresi yüzeyinde bulunan TLR'lerin ligandlarıyla doğrudan etkileşimi, tümörü kemoterapiye daha az duyarlı hale getirebilir [117].

TLR agonistleri, tümörün mikroçevresinde lokalize olan bağışıklık hücrelerinin fonksiyonunu düzenleyebildiği, apoptozu ve antitümör immün cevabı indükleyebildiğinden, TLR ligandlarını antitümör terapide kullanmak umut verici bir yaklaşım olarak görülmektedir [65].

### **3. MALZEME VE YÖNTEM**

#### **3.1 Kullanılan Kimyasallar, Kitler ve Genler**

Bortezomib (VELCADE™ 3.5mg), L-Glutamine içeren RPMI-1640 besiyeri, Penisilin/Streptomisin (10.000 U/mL penisilin, 10.000 µg/mL streptomisin), Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS), Fetal bovine serum (FBS), % 0.4 trypan blue Gibco' dan, dimetilsülfoksit (DMSO) Santa Cruz'dan, PureLink® RNA Mini Kit Ambion-Life Technologies'den ve MTT (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Serva'dan, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor, Taqman Gene Expression Master Mix, Beta Actin (VIC-MBG Probe), TLR2, 4, 3, 7, 9, MyD88 (FAM-MBG Probe) Life Technologies'den, Agaroz, Trizma® base, Etilen diamin asetik asit (EDTA) , Borik asid Sigma'dan temin edilmiştir.

Genlere ait primer çift ve Taqman problemleri içeren assay numaraları aşağıda verilmiştir.

TLR2 Hs02621280\_s1

TLR4 Hs00152939\_m1

TLR3 Hs01551078\_m1

TLR7 Hs00152971\_m1

TLR9 Hs00370913\_s1

MyD88 Hs01573837\_g1

#### **3.2 Hücre Hatlarının Çoğaltılması ve Dondurulması**

Tez çalışmasında, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition JCRB Cell Bank'tan (Japonya) temin edilen bortezomibe dirençli (KMS-20) ve hassas (KMS-28BM) multiple myeloma hücre hatları kullanılmıştır.

KMS-20 ve KMS-28BM hücre hatlarında 37°C su banyosunda çözülerek ortamdaki DMSO'nun uzaklaştırılması için phosphate buffered saline (PBS) ile oda sıcaklığında 2 kez 800 g'de 5dk santrifüj edilerek yıkandı. Hücrelerin çoğaltılması için %10 fetal bovine serum (FBS), %1 penisilin/streptomisin ve L-glutamin içeren RPMI1640 besiyeri hazırlandı. Hazırlanan besiyerinin 5mL'si alınarak 15mL'lik falkonlar da hücre ve besiyeri süspanse edilerek 25cm<sup>2</sup>'lik flakslara ekim yapıldı. Hücreler 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem varlığında CO<sub>2</sub> etüvde çoğaltıldı. Çoğalma hızını arttırmak ve kontaminasyon riskini azaltmak amacıyla düzenli olarak besiyeri değişikliği ve kontroller yapıldı. Sonuçta hücrelerin canlılığı ve sayısında artış gözlemlendi. Hücreler flaks yüzeyini tamamen kapladığında 25cm<sup>2</sup>'lik flakslardan 75cm<sup>2</sup>'lik flakslara pasajlandı. Pasajlama işlemi 1/2 veya 1/3 oranında haftada 2 veya 3 kez tekrarlandı. Çoğalan hücrelerin canlılığı ve miktarı, tripan mavisi boyası kullanılarak inverted mikroskopta hücre sayımı yapılarak kontrol edildi. Canlılıkları ve üreme koşulları optimize edilen hücreler daha sonraki kullanımlar için ve yedek hücre bankası oluşturmak için sıvı azota dondurularak saklandı. Dondurma işlemi için hücreler %20 besiyeri, %10 dimetilsülfoksit (DMSO) ve %70 FBS içeren donma mediası içinde süspanse edildi. Canlı hücre sayıları tripan mavisi ile saptanmış, donma mediası içindeki hücreler 1.5X10<sup>5</sup>-2X10<sup>6</sup> hücre/mL olacak şekilde karyovial tüplere dağıtıldı. Donma işlemi için KMS-20 ve KMS-28BM hücre hatları önce -80°C' de birgün bekletildi daha sonra saklanmak için sıvı azot tankına kaldırıldı. Tekrar kullanılmak istendiğinde sıvı azottan çıkartılıp 37°C su banyosunda çözüldü ve uygun besiyeri eklenerek çoğaltılması için CO<sub>2</sub> etüve kaldırıldı.

### **3.3 Hücre Canlılığının Saptanması**

Çoğaltılan hücrelerin canlılığı tripan mavisi kullanılarak saptandı. Tripan mavisi sadece ölü hücrelerin zarından geçebilen bir boya olmasından dolayı tripan mavisi kullanılarak ölü hücreler ile canlı hücreler inverted mikroskop altında kantitatif olarak ayrılabilirdi [117].

Çoğalan hücreler PBS ile yıkama işlemi yapılarak uygun hacimde besiyeri ile süspanse hale getirildi. Süspanse hücrelerden 10µL alınarak üzerine % 0.4 tripan mavisinden 10 µL eklendi. 3-5 dk inkübasyondan sonra thoma lamı kullanılarak inverted mikroskop altında mL'deki canlı hücre sayımı yapıldı. Canlı hücre sayısını belirlemek için aşağıdaki eşitlik kullanıldı (Eşitlik 3.1).

$$\text{Toplam Canlı Hücre Sayısı} = \text{HS} \times \text{SF} \times 10^4 \quad (3.1)$$

**HS:** Ortalama Canlı Hücre Sayısı

**SF:** Sulandırma Faktörü

% Canlılığı belirlemek amacıyla eşitlik 3.2 kullanıldı [118].

$$\% \text{ Canlılık} = (\text{Canlı Hücre Sayısı} / \text{Toplam Hücre Sayısı}) \times 100 \quad (3.2)$$

### 3.4 Hücre Proliferasyon Testi

#### 3.4.1 Sitotoksosite testi: MTT testi

MTT (3- [4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) testi kültür ortamında mitokondriyel aktivitesi devam eden canlı hücrelerin sayısal değişimi gösterir. MTT suda çözünen bir tetrazolium tuzudur. 5mg/mL olacak şekilde PBS solüsyonunda hazırlanır ve sarımtırak renk oluşturur. Tetrazolium tuzu sadece canlı hücrelerde bulunan NAD(P)H- bağımlı süksinat dehidrojenaz enzimlerince parçalanır ve mor renkli çözülebilen formazan kristallerine dönüşür. Formazan kristalleri HCl- İzopropanol ya da DMSO ile çözüldükten sonra oluşan rengin absorbansı eliza cihazında okunur [117].

Bu tez çalışmasında MTT testi için uygun besiyeri içindeki hücre kuyucuk başında  $1 \times 10^4 / 100 \mu\text{L}$  olacak şekilde 96 kuyucuklu mikroyuvarlara eklendi. 12, 24 ve 48 saatlik çalışmalar için hazırlanan pleytlere birgün sonra farklı konsantrasyonda ilaç eklenerek total hacim  $200 \mu\text{L}$ 'ye tamamlandı. İlaç uygulanmış hücreler  $37^\circ\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$ , %95 nem varlığında 12, 24 ve 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her kuyucuğa  $20 \mu\text{L}$  MTT solüsyonu eklenerek pleytler  $\text{CO}_2$  etüvde 4 saat bekletildi. İnkübasyon sonrası hücrelerin üzerindeki besiyeri çekilerek her bir kuyucuğa  $100 \mu\text{L}$  DMSO eklendi ve  $37^\circ\text{C}$ 'de 5-10 dk  $\text{CO}_2$  etüvde inkübe edildi. Açığa çıkan renk Chromate Eliza okuyucuda 492 nm dalga boyunda okundu.

### 3.5 KMS-20 ve KMS-28BM Hücre Hatlarında İlaç Uygulaması

#### 3.5.1 Bortezomib uygulaması

Bortezomibin (VELCADE™ 3.5 mg), KMS-20 ve KMS-28BM hücreleri üzerindeki % canlılığa etkileri MTT test uygulanarak saptandı. Bortezomibin dirençli KMS-20 ve hassas KMS-28BM hücre hatlarında canlılık üzerinde %50 inhibasyona ( $\text{IC}_{50}$ ) neden olduğu konsantrasyon aralığını belirlemek amacıyla MTT testi uygulandı. MTT testi için kuyucuk başına hücre sayısı  $1 \times 10^4 / 100 \mu\text{L}$  olacak şekilde hücre sayısı sabit tutuldu. KMS-20 ve KMS28BM hücre hatlarında  $\mu\text{L}$ 'de 100 hücre

olacak şekilde hesaplama yapılarak 96'lık mikroplyetler hazırlandı. Seri sulandırma yapılarak hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki bortezomib, KMS-20 ve KMS28BM hücre hatlarına 12, 24 ve 48 saatlik uygulama için eklendi ve MTT testi uygulandı.

KMS-20 hücre hattı için 0,1nM-100nM, KMS-28BM için 0,01nM-50nM aralığında konsantrasyonlar çalışıldı. Farklı zamanlarda yapılan 3 farklı deneyde ve her bir konsantrasyon için 8 kuyucuk çalışılarak tüm deneylerden elde edilen verilerin ortalaması alınarak IC<sub>50</sub> değerini veren en uygun aralık hesaplandı. IC<sub>50</sub> değeri her konsantrasyon için kontrol grubu referans alınarak hesaplandı.

### 3.6 Dirençlilik İndeksi

Bortezomibin KMS-20 ve KMS-28BM hücre hatlarının canlılığını %50 inhibe ettiği (IC<sub>50</sub>) konsantrasyon aralığı MTT testi yapılarak belirlendi. MTT sonuçlarına göre dirençli KMS-20 hücre hattının bortezomib için dirençlilik indeksi (RI) eşitlik (3.3)' te gösterildiği gibi hesaplandı [119].

$$RI = \frac{IC_{50} \text{ Dirençli hücre}}{IC_{50} \text{ Hassas hücre}} \quad (3.3)$$

### 3.7 RNA İzolasyon Aşaması

RNA izolasyonundan önce kullanılacak tüm cihazlar, araçlar ve yüzeyler % 70'lik etil alkolle temizlendi. RT-PCR yönteminin gerçekleştirilmesi için 12, 24 ve 48 saatlik bortezomib uygulanan dirençli KMS-20 ve hassas KMS-28BM hücre hatlarından RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Ambion PureLink® mini RNA izolasyon kiti kullanılarak prosedüre uygun şekilde total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon aşamaları aşağıda sırasıyla verilmiştir.

- 6' lık mikroplyetlerdeki hücreler 15mL'lik falkonlara alınarak 2000 g' de 4°C' de 5 dk da 2 kez santrifüj edildi. Üst faz atıldı.
- Her tüpe %1' lik 2-merkaptetanol içeren "Lizis Buffer" dan 0.6 mL eklendi. Hücre peleti dağılana kadar vorteksleme işlemi gerçekleştirildi.
- Hücrelerin üzerine 1:1 hacimde %70' lik etil alkol eklendi ve karıştırıldı.
- Örneklerden 700 µL alınarak koleksiyon tüplerine dağıtıldı.
- Koleksiyon tüpüne aktarılan örnekler oda sıcaklığında 12.000 g' de 15 sn. santrifüj edildi ve her seferinde alt faz atıldı ve işlem 2 kez tekrarlandı.

- Her koleksiyon tüpüne % 96-100' lük etanol içeren "Wash Buffer I" den 700 µL ilave edildi.
  - Örnekler oda sıcaklığında 12.000 g' de 15 sn. santrifüj edildi. Alt faz atıldı.
  - Yeni koleksiyon tüplerine aktarılan örneklerin üzerine 500 µL Wash Buffer II eklendi.
  - Örnekler oda sıcaklığında 12.000 g' de 15 sn. santrifüj edildi. Alt faz atıldı.
  - Koleksiyon tüpündeki örnekler oda sıcaklığında 12.000 g' de 2 dk boş santrifüj edilerek RNA' nın membrana bağlanması sağlandı.
  - Koleksiyon tüpleri toplama tüpleriyle değiştirildi.
  - Tüpün merkezine gelecek şekilde RNase-Free sudan 50 µL eklendi.
- Oda sıcaklığında 1 dk inkübasyon yapılarak 12.000 g' de 2 dk santrifüj edildi ve bu işlem 2 kez tekrarlandı.

İzolasyonu yapılan RNA'ların miktarı ve saflığı Nanodrop 2000 (Thermo) cihazı kullanılarak saptandı. RNA'lar daha sonra yapılacak olan gen ifadesi çalışmalarında kullanılmak üzere -80 °C' ye kaldırıldı.

### 3.7.1 RNA miktarının ve saflığının belirlenmesi

İzole edilen total RNA'nın saflığı ve miktarı Nanodrop 2000 (Thermo) cihazı kullanılarak belirlendi. Bunun için 260, 280 ve 230 nm dalga boylarında absorbans ölçümleri yapıldı. 260, 280 ve 230 nm dalga boyu absorbans ölçümleri sırasıyla nükleik asit, protein değerlerini ve organik moleküllerin kontaminasyonunu göstermektedir. RNA'ların saflığı 260 nm'daki absorbansın değerinin diğerlerine bölünmesi ile hesaplanır. RNA izolasyonunda 260/280 ve 260/230 oranları sırasıyla yaklaşık olarak 2.0 ve 1.8 değerinde olması beklenir. İdeal bir RNA izolasyonunda 260/280 absorbans değeri 2.0 civarında olmalıdır.

Her bir örnekteki RNA miktarı eşitlik 3. 4 de verildiği gibi hesaplandı.

$$\text{RNA}(\mu\text{g/mL}) = A_{260 \text{ nm}} \times \text{SF} \times 40 \mu\text{g/mL} \quad (3.4)$$

$$A_{260} = 260 \text{ nm'daki Absorbans Değeri}$$

$$\text{SF} = \text{Sulandırma Faktörü}$$

$$40 \mu\text{g/mL} = \text{RNA'nın Ortalama katsayısı}$$

### 3.8 Agoraz Jel Elektroforez Aşaması

RNA' nın saflığı ve miktarı saptandıktan sonra izole edilen RNA'ların doğruluğu 1X Tris-Borat-EDTA (TBE, pH: 8,3) tamponu kullanılarak %1'lik agaroz jel

elektroforezi yapılarak kontrol edildi. Bantlar Etidyum bromür ile boyandı ve görüntüleme cihazında (UVITEC Cambridge) görüntülendi.

### 3.9 RT-PCR Yöntemi İle Gen İfade Düzeylerinin Saptanması

#### 3.9.1 Komplementer DNA (cDNA) sentezi

Komplementer DNA (cDNA) sentezlemek için RNase-free ve Nükleaz-free ekipmanlar kullanıldı. cDNA sentezi için 1 µg/mL total RNA ve High-Capacity (Life Tech) revers transkriptaz enzim kiti kullanıldı. 0.5 mL'lik PCR tüpünde 20 µL'lik bir reaksiyon için 1 µg/mL RNA son hacim 10 µL olacak şekilde nükleaz-free su içinde karıştırıldı. Üzerine çizelge 3.1'de verilen cDNA mix karışımdan her tüpe 10µL ilave edilerek çizelge 3.2'de gösterilen cDNA programı kullanılarak sentez gerçekleştirildi. cDNA'lar RT-PCR da kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

**Çizelge 3.1:** cDNA karışımı için gerekli miktarlar

| <b>cDNA Mix</b>    | <b>1X</b>   |
|--------------------|-------------|
| 10x RT Buffer      | 2µL         |
| dNTP Mix           | 0,8µL       |
| Primer             | 2µL         |
| Enzim              | 1µL         |
| RNase free su      | 4,2µL       |
| <b>Total hacim</b> | <b>10µL</b> |

**Çizelge 3.2:** cDNA sentez için gerekli PCR programı

|                 | <b>1. Adım</b> | <b>2.Adım</b> | <b>3. Adım</b> | <b>4. Adım</b> |
|-----------------|----------------|---------------|----------------|----------------|
| <b>Sıcaklık</b> | 25 °C          | 37 °C         | 85 °C          | 4 °C           |
| <b>Zaman</b>    | 10dk           | 120dk         | 5 dk           | ∞              |

### 3.9.2 Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR)

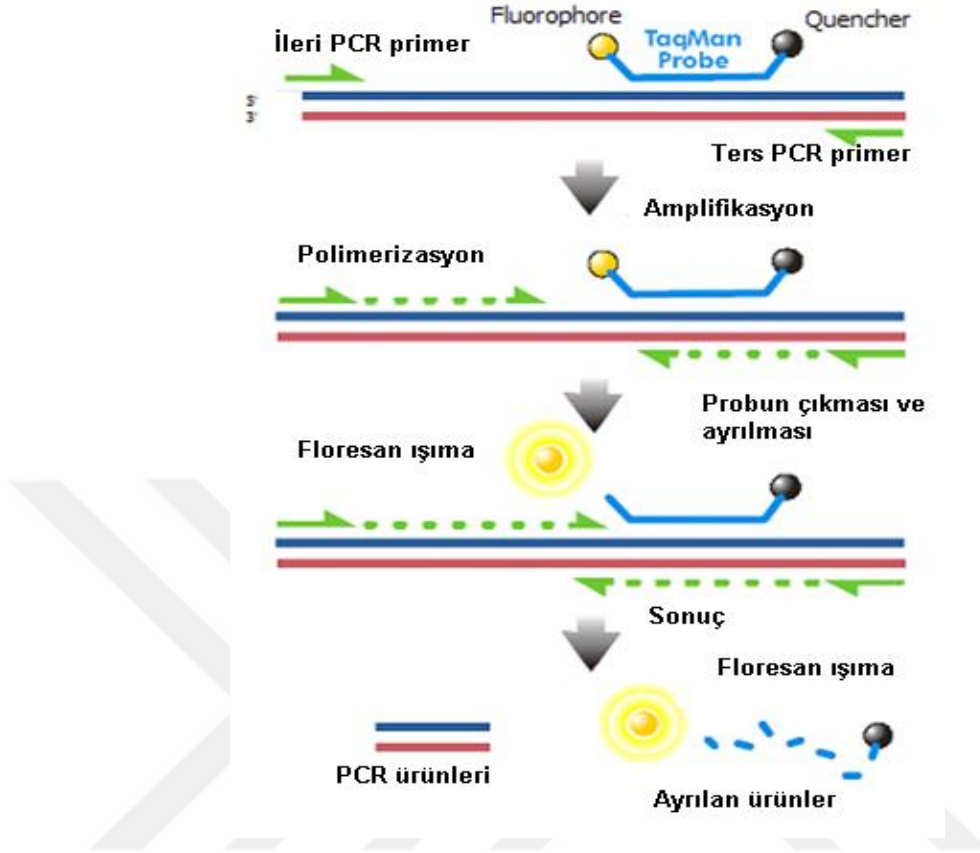
PCR rnlerinin gerçek zamanlı niceliksel analizi 1990’larda geliştirilen RT-PCR yöntemiyle mümkün olmuştur. Bu yöntemde PCR reaksiyonunun geometrik artışı sırasında floresan sinyaller toplanarak ürünlerin niceliksel olarak analizi yapılabilir. PCR döngüsü sırasında DNA miktarı artıkça floresan ışıma artar ve oluşan ışıma noktası Cp (Crossing point) olarak adlandırılır. Cp değeri ile örneklerin başlangıç DNA miktarı birbiriyle karşılaştırılabilir. RT-PCR ışıma eğrisi belirli bir döngüden sonra plato fazına geçer [120].

RT-PCR DNA kopyasının sayısal verilere dönüştürme ve mRNA miktarını belirlemede en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Bunun yanında tek nokta mutasyonları, DNA hasarı, metilasyon tespiti, SNP analizi, patojen belirleme ve kromozom bozukluklarının tespiti gibi birçok alanda kullanımını mevcuttur [121].

PCR sürecinden önce reverse (ters) transkriptaz enzimi ile mRNA’lar cDNA’ya çevrilir. Reaksiyonlarda floresan sinyal kaynağı olarak hidroliz problemleri, hibridizasyon problemleri, TaqMan® problemleri, Molecular Beacon® problemleri ve SYBR® Green I boyası gibi primerlere bağlı ya da primerlerden bağımsız floresan ışaretleyiciler kullanılır. Bu floresan ışaretleyiciler çift zincirli DNA’ya bağlanır ve çift zincirli DNA’nın artışı ile doğru orantılı olarak floresan ışıma verir. Hedeflenen bölgenin çoğalıp çoğalmadığı reaksiyondan sonra erime eğrisi (melting curve) analizi ya da ürünlerin jel elektroforez analizi ile tespit edilebilir [122, 123].

Bu tez çalışmasında, gen ekspresyon analizi için TaqMan prob kullanılarak qRT-PCR yapıldı. TaqMan problemleri ile yapılan qRT-PCR’da floresans boya kullanılmakta fakat bu boya doğrudan reaksiyona girmemektedir. Bu yöntemde, sağ ve sol yönde ilerlemeyi sağlayacak bir çift primer setinin yanında 8–9 nükleotitten oluşan problemler kullanılmaktadır. Floresans boya probun sentezlenmesi sırasında üzerine yerleştirilir (reporter) ve sadece DNA’daki özgün bölgesine bağlandığı zaman ışıma vermesi için de probun diğer ucuna ışıma oluşumunu engelleyecek bir başka kimyasal yapı konulur (quencher). şekil 3.1’de görüldüğü gibi, reaksiyon esnasında DNA denatürasyonunu takiben hem primerler hem de prob DNA zerindeki özgün bölgelerine bağlanırlar. Bu esnada prob herhangi bir ışıma vermemektedir. Reaksiyonun uzama fazında primerlerden başlayarak yeni DNA iplikçiğinin

oluşması ile birlikte prob da yerinden ayrılır ve prob uzaklaşması ile birlikte ışımaya verir. TaqMan prob yalnızca özgün ürün oluşursa ışımaya vermektedir.

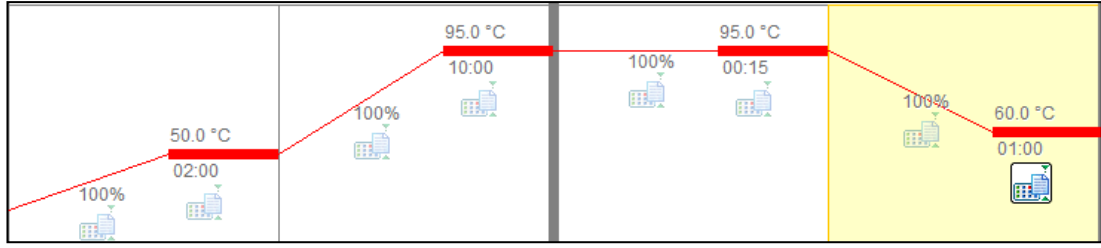


**Şekil 3.1:** TaqMan probun çalışma prensibi [124].

Çalışmamızda iki hücre hattında bulunan tüm gruplarda TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR9, MYD88 genlerine ilaveten endojen kontrol olarak  $\beta$ -actin geni kullanıldı. Tüm cDNA'lerden gen ekspresyonu çalışması ABI 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Farklı zamanlarda yapılmış 2 ayrı deney ve her deneyde tüm örnekler 3 tekrar olacak şekilde çalışıldı. Negatif kontrol olarak cDNA içermeyen reaksiyon karışımı kullanıldı. qRT-PCR için reaksiyon koşulları çizelge 3.3' de ayrıca qRT-PCR için amplifikasyon basamakları şekil 3.2'de verilmiştir.

**Çizelge 3.3:** qRT-PCR reaksiyon koşulları

|                      |            |
|----------------------|------------|
| <b>Gen</b>           | 1 $\mu$ L  |
| <b>Master Mix</b>    | 10 $\mu$ L |
| <b>RNase Free Su</b> | 7 $\mu$ L  |
| <b>cDNA</b>          | 2 $\mu$ L  |
| <b>Total Hacim</b>   | 20 $\mu$ L |



**Şekil 3.2: qRT-PCR amplifikasyon basamakları**

### 3.9.3 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Yöntemi kullanılarak qRT-PCR ürünlerinin miktarının hesaplanması

Gen ekspresyonunda göreceli miktar tayini  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metodu kullanılarak gerçekleştirildi [125]. %100'e yakın verimlilikteki reaksiyonlar güvenilir bir miktar tayini için seçildi.  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metodunda gen ekspresyonundaki göreceli değişiklik bir gen ifade düzeyi durumudur. Gen ifade düzeyleri bir kalibratör (örn; ilaç uygulanmayan referans örnek, kontrol) ile deneysel örneklerin (örn; İlaç tedavisi yapılan örnek) karşılaştırılması ve endojen kontroldeki ( $\beta$ -aktin) miktar verilerinin normalleştirilmesiyle elde edildi. Hedef genin kontrol grubuna göre ifade düzeyindeki katlık değişim (Relative kantitasyon (RQ)) değeri  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  eşitliğinden hesaplandı. Gen ifade düzeylerini saptamak için kullanılan eşitlik 3. 5'te gösterildi.

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

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

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

$$\Delta\Delta C_t = [C_t (\text{Hedef gen}) - C_t (\text{Referans gen})]_{\text{çalışma g}} - [C_t (\text{Hedef gen}) - C_t (\text{Referans gen})]_{\text{kontrol g}}$$

$$\text{Gen İfade Düzeyi} = 2^{-\Delta\Delta C_t} \quad (3.5)$$

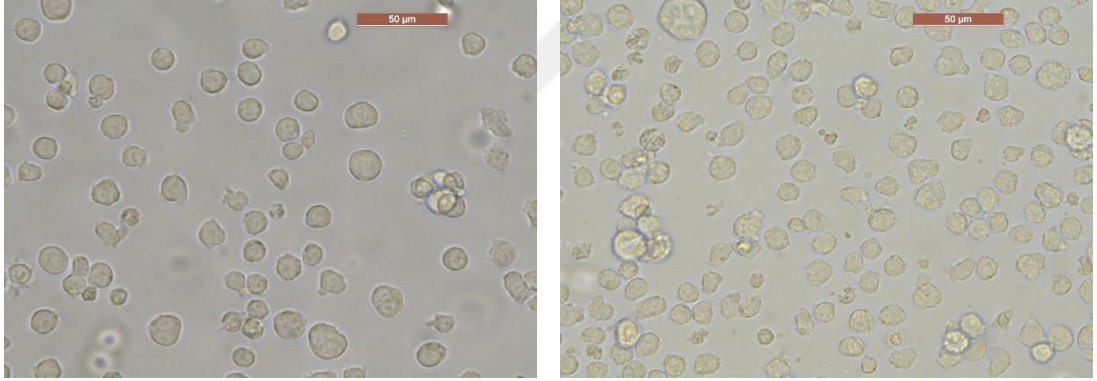
### 3.10 İstatistiksel Değerlendirme

Tüm analizler IBM SPSS Statistictics 21 programı kullanılarak yapıldı. Tüm deneysel verilerde gruplar arasındaki anlamlılık ve farklılıklar One-way ANOVA, Tukey Multi-Comparison Pot testi yapılarak p değerleri hesaplandı. Gruplar arasında fark  $p < 0.05$  olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

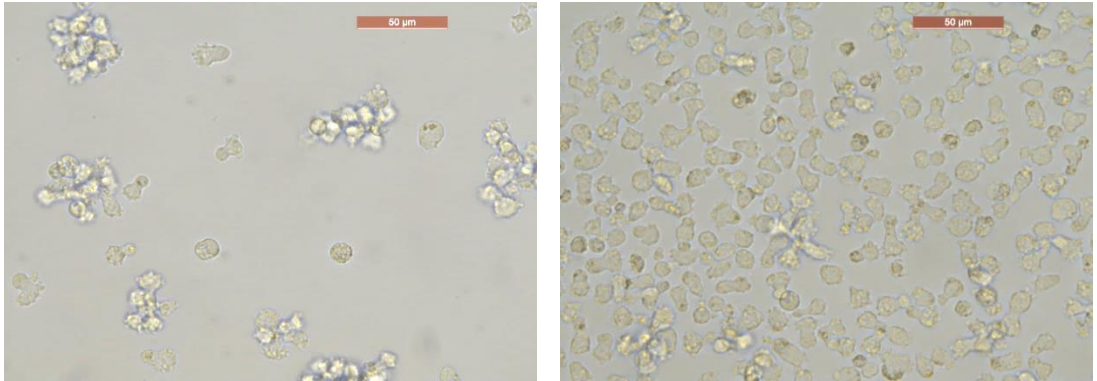
## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1 Hücre Hatlarının Çoğaltılması ve Canlılığı

KMS-20 ve KMS-28BM hücre hatları %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve L-glutamin içeren RPMI 1640 besiyeri kullanılarak %5 CO<sub>2</sub>, 37 °C sıcaklık ve %95 nem koşullarında etüvde çoğaltıldı. Çoğalan hücrelerin kontaminasyon riskine karşı her gün besiyeri ortamındaki renk değişimleri kontrol edildi. Çoğalan hücrelerin canlılığı ve miktarı tripan mavisi boyası kullanılarak inverted mikroskopta hücre sayımı yapılarak kontrol edildi. Flaksı kaplayan hücreler uygun besiyeri eklenerek 75cm<sup>2</sup>'lik flakslara pasajlandı ve düzenli olarak kontrolleri yapılarak inverted mikroskopta görüntüleri çekildi. KMS20 ve KMS-28BM hücre hatlarına ait 40X objektifteki görüntüler Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de görülmektedir.



Şekil 4.1:KMS-20 hücre hattına ait 40X objektif görüntüsü



Şekil 4.2: KMS-28BM hücre hattına ait 40X objektif görüntüsü

KMS-20 ve KMS-28BM hücre hatlarının canlılığı ve miktarını belirleme tripan mavisi kullanılarak yapıldı. Tripan mavisi sadece ölü hücreleri boyamaktadır. PBS ile sulandırma yapılan süspanse hücreden ve tripan mavisi boyadan 1:1 (v/v) oranında alınarak ependorfta karıştırıldı. 3-5 dk tripan mavisinin ölü hücreleri boyaması beklendi. Daha sonra thoma lamına aktararak inverted mikroskop kullanılarak sayımı yapıldı.

#### **4.2 Sitotoksikite Testi: MTT Testi**

Bu tez çalışmasında bortezomibin dirençli KMS-20 ve hassas KMS-28BM hücre hatlarındaki % canlılığa etkisi MTT test uygulanarak belirlendi. MTT test sonuçlarının ölçümleri Chromate eliza cihazında, 492 nm dalga boyunda okunarak yapıldı. Her deneyde tüm konsantrasyonların % canlılık değeri kontrol grubuna göre hesaplandı. Kontrol grubunun canlılığı %100 alındı. 12, 24 ve 48 saatlik çalışmaların farklı zaman ve günlerde yapılan deney verilerinin ortalamaları alınarak 12, 24 ve 48 saatlik çalışmaların IC<sub>50</sub> değerini veren en uygun aralık belirlendi.

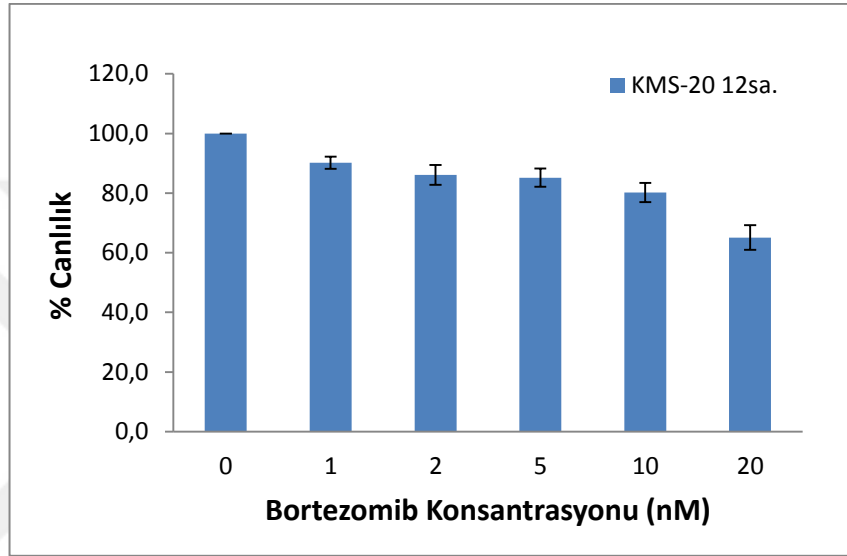
#### **4.3 Bortezomib Uygulanması**

##### **4.3.1 KMS-20 hücre hatlarına 12, 24 ve 48 saatlik bortezomib uygulanması**

Bortezomibin dirençli KMS-20 hücre hattı üzerindeki % canlılığa etkileri 12, 24 ve 48 saatlik MTT testi uygulanarak saptandı. Bortezomibin dirençli (KMS-20) hücre hattının %50 inhibisyona (IC<sub>50</sub>) neden olduğu aralığı belirlemek için 1nM-20nM arasında konsantrasyonlar çalışıldı (Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3). Farklı zamanlarda yapılan 3 farklı deneyde ve her bir konsantrasyon için 8 kuyucuk çalışılarak tüm deneylerden elde edilen verilerin ortalaması alınarak IC<sub>50</sub> değerini veren 12, 24 ve 48 saatlik çalışmalarda en uygun aralık hesaplandı. Şekil 4. 3, 4. 4 ve 4. 5' te bortezomib uygulamasının 12, 24 ve 48 saatlik % canlılık grafikleri görülmektedir. Şekil 4. 6' da ise 12, 24 ve 48 saatlik % canlılığın karşılaştırıldığı grafik görülmektedir.

**Çizelge 4.1:**KMS-20 hücre hattındaki 12 saatlik bortezomib uygulamasının % canlılık ve standart sapma değerleri.

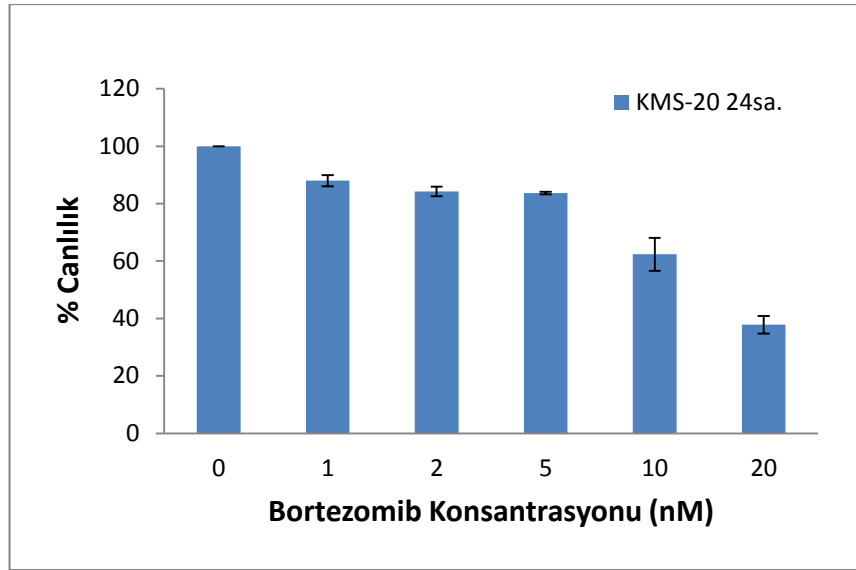
| Bortezomib (nM)              | 0         | 1          | 2          | 5          | 10         | 20        |
|------------------------------|-----------|------------|------------|------------|------------|-----------|
| % Canlılık ve Standart Sapma | 100,0±0,0 | 90,2 ± 2,1 | 86,1 ± 3,3 | 85,2 ± 3,1 | 80,3 ± 3,2 | 65,1± 4,1 |



**Şekil 4.3:** 12 saatlik bortezomib uygulamasının KMS-20 hücre hattındaki % canlılığa etkisi.

**Çizelge 4.2:** KMS-20 hücre hattındaki 24 saatlik bortezomib uygulamasının % canlılık ve standart sapma değerleri.

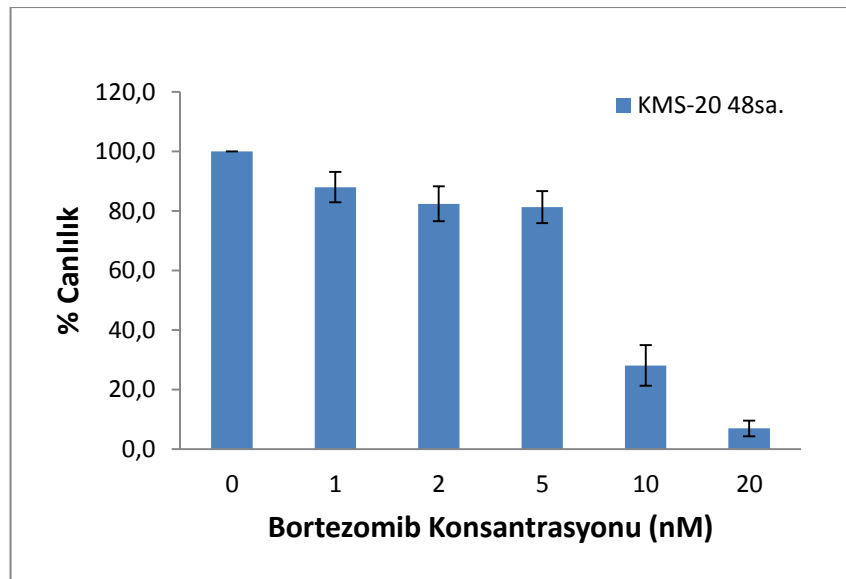
| Bortezomib (nM)              | 0         | 1         | 2         | 5         | 10        | 20        |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| % Canlılık ve Standart Sapma | 100,0±0,0 | 88,0± 1,9 | 84,2± 1,7 | 83,7± 0,4 | 62,4± 5,7 | 37,8± 3,0 |



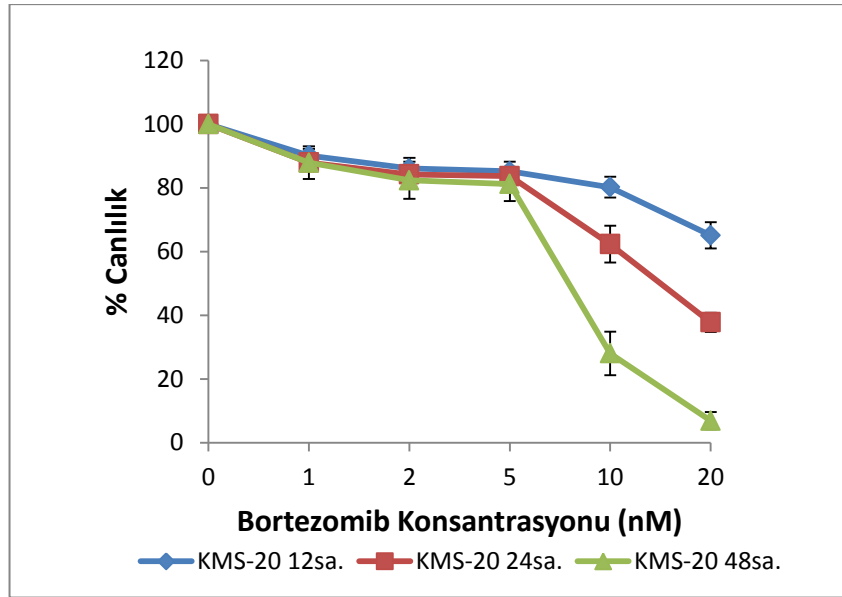
**Şekil 4.4:** 24 saatlik bortezomib uygulamasının KMS-20 hücre hattındaki % canlılığa etkisi.

**Çizelge 4.3:** KMS-20 hücre hattındaki 48 saatlik bortezomib uygulamasının % canlılık ve standart sapma değerleri.

| Bortezomib (nM)              | 0         | 1         | 2         | 5         | 10        | 20       |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|
| % Canlılık ve Standart Sapma | 100,0±0,0 | 87,9± 5,1 | 82,4± 5,8 | 81,3± 5,4 | 28,1± 6,8 | 7,0± 2,7 |



**Şekil 4.5:** 48 saatlik bortezomib uygulamasının KMS-20 hücre hattındaki % canlılığa etkisi.



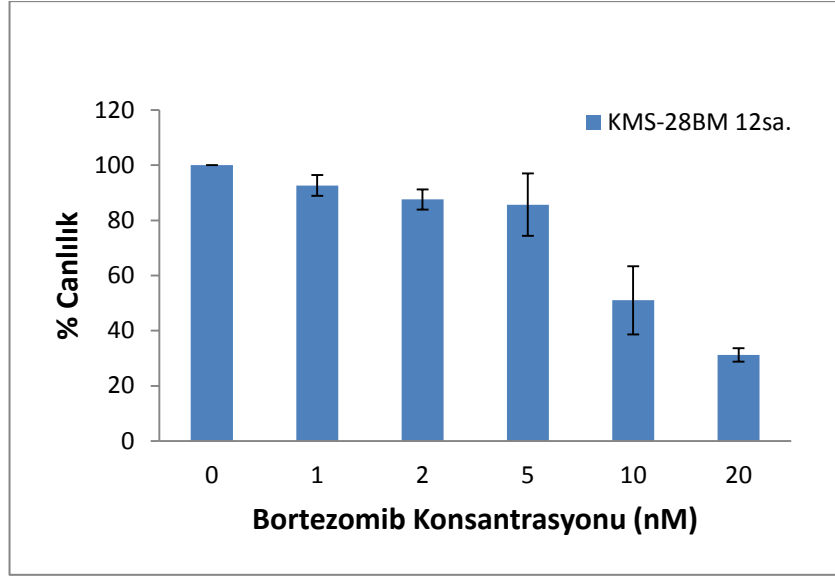
**Şekil 4.6:** Bortezomibin KMS-20 hücre hattındaki % canlılığa etkisi.

#### 4.3.2 KMS-28BM hücre hattına 12, 24 ve 48 saatlik bortezomib uygulanması

Bortezomibin dirençli KMS-28BM hücre hattı üzerindeki % canlılığa etkileri 12, 24 ve 48 saatlik MTT testi uygulanarak saptandı. Bortezomibin hassas (KMS-28BM) hücre hattının %50 inhibisyona ( $IC_{50}$ ) neden olduğu aralığı belirlemek için 1nM-20nM arasında konsantrasyonlar çalışıldı (Çizelge 4. 4, 4. 5 ve 4. 6). Farklı zamanlarda yapılan 3 farklı deneyde ve her bir konsantrasyon için 8 kuyucuk çalışılarak tüm deneylerden elde edilen verilerin ortalaması alınarak  $IC_{50}$  değerini veren 12, 24 ve 48 saatlik çalışmalarda en uygun aralık hesaplandı. Şekil 4. 7, 4. 8 ve 4. 9'da bortezomib uygulamasının 12, 24 ve 48 saatlik % canlılık grafikleri görülmektedir. Şekil 4.10' da ise 12, 24 ve 48 saatlik % canlılığın karşılaştırıldığı grafik görülmektedir.

**Çizelge 4.4:** KMS-28BM hücre hattındaki 12 saatlik bortezomib uygulamasının % canlılık ve standart sapma değerleri.

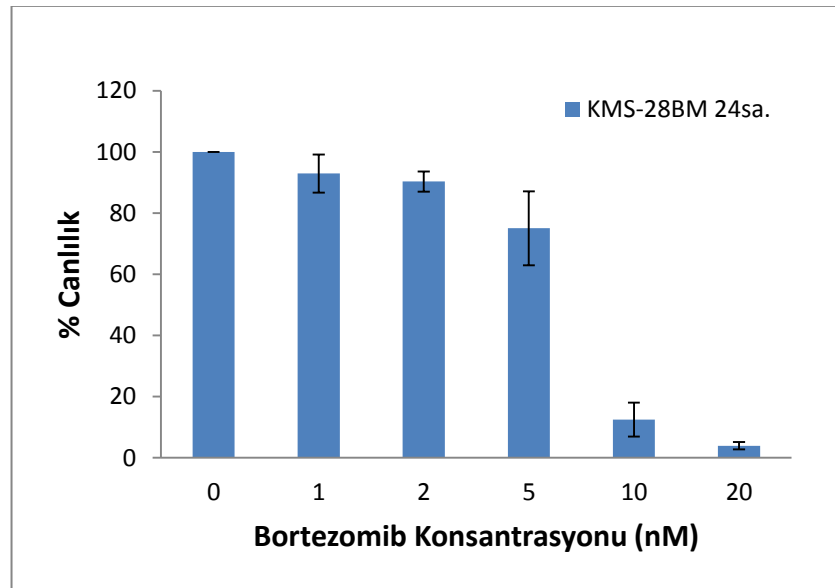
| Bortezomib (nM)              | 0         | 1         | 2         | 5         | 10        | 20       |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|
| % Canlılık ve Standart Sapma | 100,0±0,0 | 92,7± 3,7 | 87,6± 3,6 | 85,7±11,3 | 51,0±12,4 | 31,2±2,4 |



**Şekil 4.7:** 12 saatlik bortezomib uygulamasının KMS-28BM hücre hattındaki % canlılığa etkisi.

**Çizelge 4.5:** KMS-28BM hücre hattındaki 24 saatlik bortezomib uygulamasının % canlılık ve standart sapma değerleri.

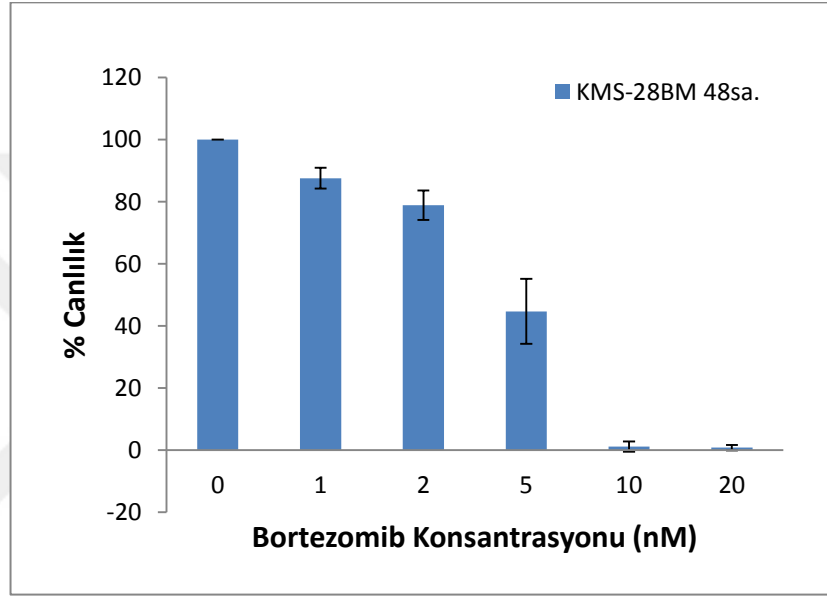
| Bortezomib (nM)              | 0         | 1         | 2         | 5         | 10        | 20       |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|
| % Canlılık ve Standart Sapma | 100,0±0,0 | 92,9± 6,2 | 90,3± 3,3 | 75,1±12,1 | 12,5± 5,5 | 4,0± 1,2 |



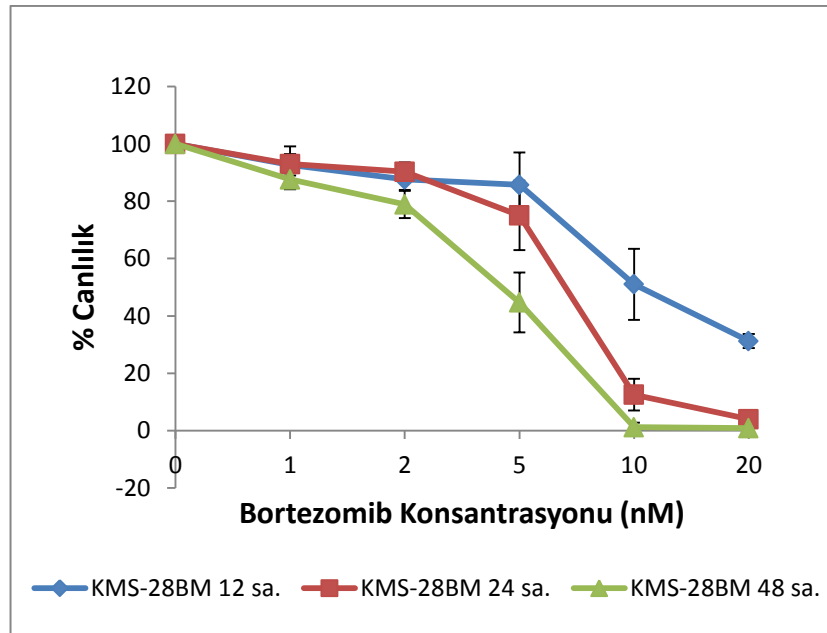
**Şekil 4.8:** 24 saatlik bortezomib uygulamasının KMS-28BM hücre hattındaki % canlılığa etkisi.

**Çizelge 4.6:** KMS-28BM hücre hattındaki 48 saatlik bortezomib uygulamasının % canlılık ve standart sapma değerleri.

| Bortezomib (nM)              | 0         | 1         | 2         | 5         | 10       | 20       |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|
| % Canlılık ve Standart Sapma | 100,0±0,0 | 87,6± 3,4 | 78,9± 4,8 | 44,7±10,4 | 1,2± 1,7 | 0,8± 0,9 |



**Şekil 4.9:** 48 saatlik bortezomib uygulamasının KMS-28BM hücre hattındaki % canlılığa etkisi.



**Şekil 4.10:** Bortezomibin KMS-28BM hücre hattındaki % canlılığa etkisi.

#### 4.4 KMS-20 ve KMS-28BM hücre hatları RI (dirençlilik indeksi) hesabı

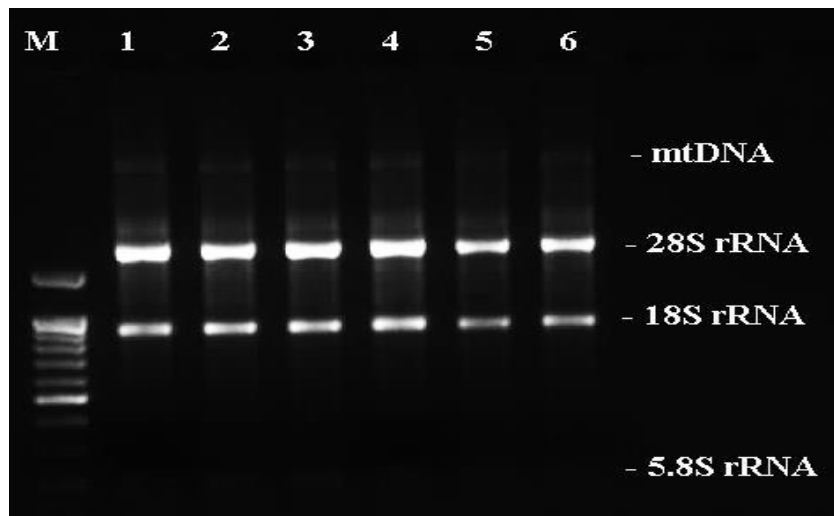
MTT sonuçlarına göre elde edilen IC<sub>50</sub> değerlerinden dirençli hücrenin IC<sub>50</sub> değerinin hassas hücrenin IC<sub>50</sub> değerine bölünmesiyle dirençlilik indeksi (RI) hesaplandı. MM hücrelerinin bortezomibe olan dirençliliği test edildi. Sonuçlar çizelge 4.7’de verilmiştir.

**Çizelge 4.7:** KMS-20’nin bortezomibe karşı dirençlilik indeksi.

|                 | 12 sa. Bortezomib<br>IC <sub>50</sub> (nM) | 24 sa. Bortezomib<br>IC <sub>50</sub> (nM) | 48 sa. Bortezomib<br>IC <sub>50</sub> (nM) |
|-----------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|
| <b>KMS-20</b>   | 31,62                                      | 15,85                                      | 5,89                                       |
| <b>KMS-28BM</b> | 11,84                                      | 5,30                                       | 3,66                                       |
| <b>RI</b>       | 2,67                                       | 2,99                                       | 1,61                                       |

#### 4.5 KMS-20 ve KMS-28BM Hücre Hatlarında RNA İzolasyon Aşaması

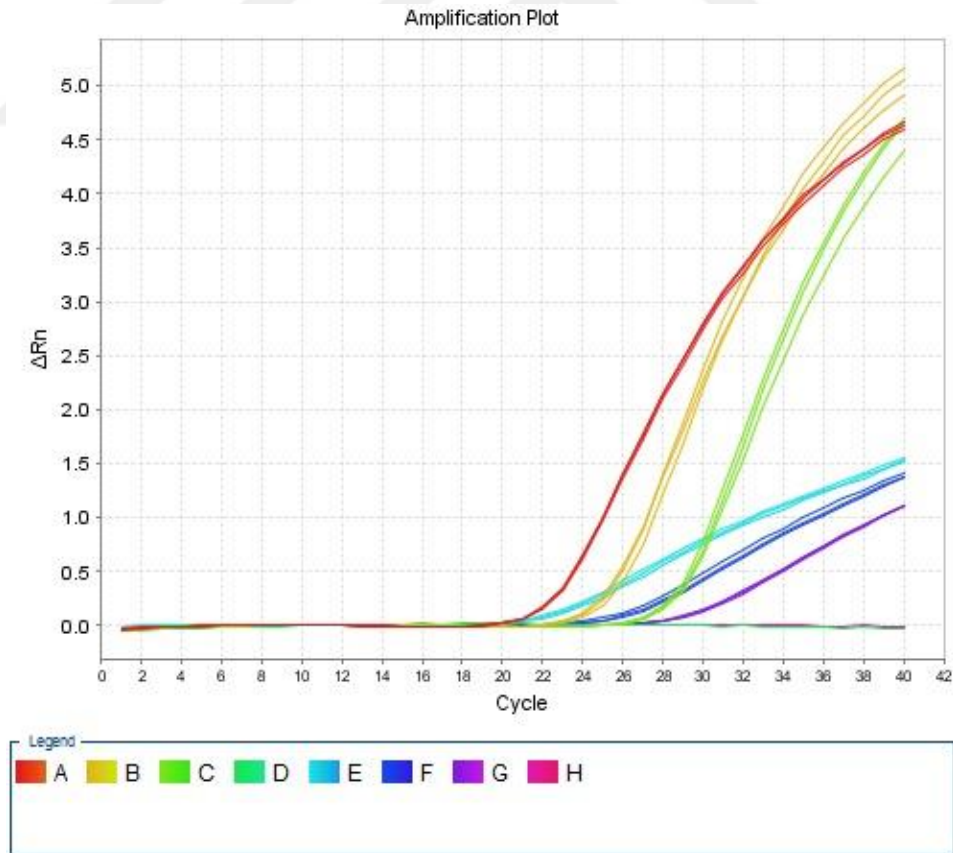
12, 24 ve 48 saatlik bort uygulanma çalışmalarının ardından total RNA izolasyonları PureLink® RNA Mini Kit (Ambion-Life Technologies) protokolü kullanılarak gerçekleştirildi. İzolasyonun ardından RNA’ların saflığı ve miktarı Nanodrop 2000 (Thermo) cihazı kullanılarak belirlendi. RNA’ların kontrolü için %1’ lik agaroz jel elektroforezi yapıldı. Şekil 4.11’ de KMS-20 Kontrol 12sa. , KMS-28BM 2nM 12 sa. , KMS-20 Kontrol 24 sa. , KMS-28BM Kontrol 24 sa. , KMS-20 2nM 48sa. , KMS-28BM 2nM 48 saatlik grupların total RNA izolasyonunun %1’ lik agaroz jel görüntüsü görülmektedir.



**Şekil 4.11:**Total RNA’ların %1’lik agaroz jel görüntüsü.

#### 4.6 Gen Ekspresyon Analizleri

Gen ekspresyonu çalışmalarını yapmak amacıyla ABI 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystem) cihazı kullanıldı. Ayrıca ekspresyon reaksiyonları (Life Tech firmasından temin edilen) TaqMan problemleri kullanılarak gerçekleştirildi. Gen ekspresyonu çalışmalarında tüm hücre hatlarında daimi olarak eksprese edildiği bilinen  $\beta$ -actin geni referans gen olarak kullanıldı. Tüm ekspresyon aşamalarında her gen tek başına çalışıldı. Her örnek 3 tekrar olacak şekilde çalışıldı. Negatif kontrol olarak cDNA içermeyen reaksiyon karışımı kullanıldı. qRT-PCR için reaksiyon koşulları çizelge 3.3’ de ayrıca qRT-PCR için amplifikasyon basamakları şekil 3.2’de verilmiştir. Her gen için kat-değişimini ifade eden eşitlik 3.5’ de gösterilen  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  değeri  $\beta$ -actin geninin  $C_t$  değeri referans alınarak hesaplandı. Elde edilen kat-değişimi değerleri ile birlikte gen ekspresyon analizleri yapıldı. Genlerin PCR verimliliği için optimizasyon çalışması yapıldı. KMS-28BM hücre hattına ait 12 saatlik örnek kontrol grubu 1/10 ve 1/100 dilüe edilerek TLR2 ve endojen kontrol  $\beta$ -actin geninin PCR verimliliği test edilmiştir. Şekil 4.12’de görülmektedir.



Şekil 4.12: KMS-28BM kontrol grubunun 12 saatlik RT-PCR verimlilik grafiği.

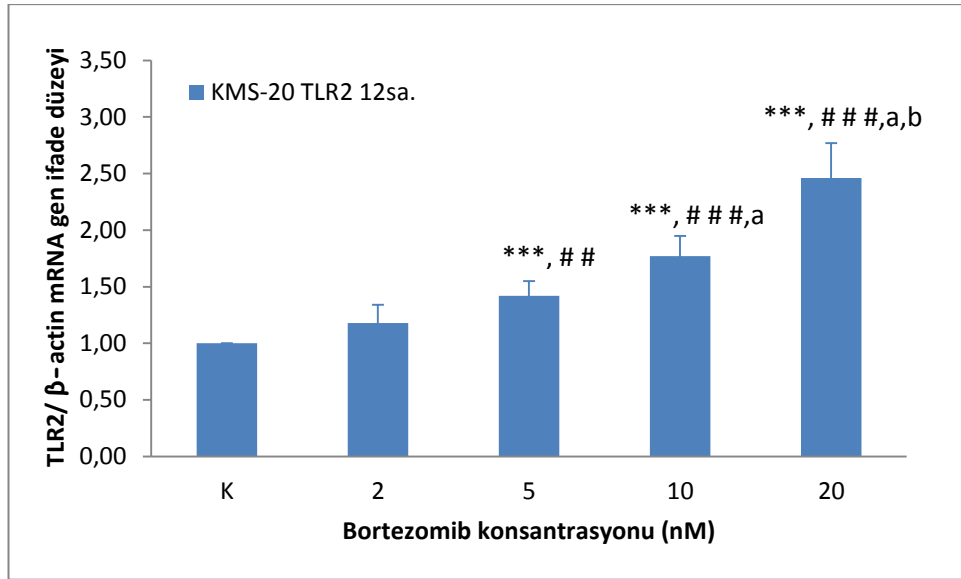
#### 4.6.1 TLR2 gen ifade düzeyleri

KMS-20 ve KMS-28BM hücre hattında farklı bortezomib konsantrasyonlarının 12, 24 ve 48 saatlik uygulamasından sonra elde edilen TLR2 mRNA gen ifade düzeyleri kantitatif real time RT-PCR (qRT-PCR) yöntemi kullanılarak saptanmıştır. Her genin kontrol grubuna göre gen ifade düzeyindeki katlık değişim (Relative kantitasyon (RQ))  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  değerleri hesaplanmıştır. KMS-20 ve KMS-28BM hücre hatlarındaki TLR2 gen ifadesinin doz ve zamana bağlı RQ ve standart sapma değerleri çizelge 4. 8 ve 4. 9’da verilmiştir. KMS-20 hücre hattında TLR2 gen ifade düzeyleri şekil 4. 13, 4. 14, 4.15’ te KMS-28BM hücre hattındaki TLR2 gen ifade düzeyleri ise şekil 4. 17, 4.18, 4. 19’ da verilmiştir.

##### 4.6.1.1 KMS-20 hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR2 gen ifade düzeyleri

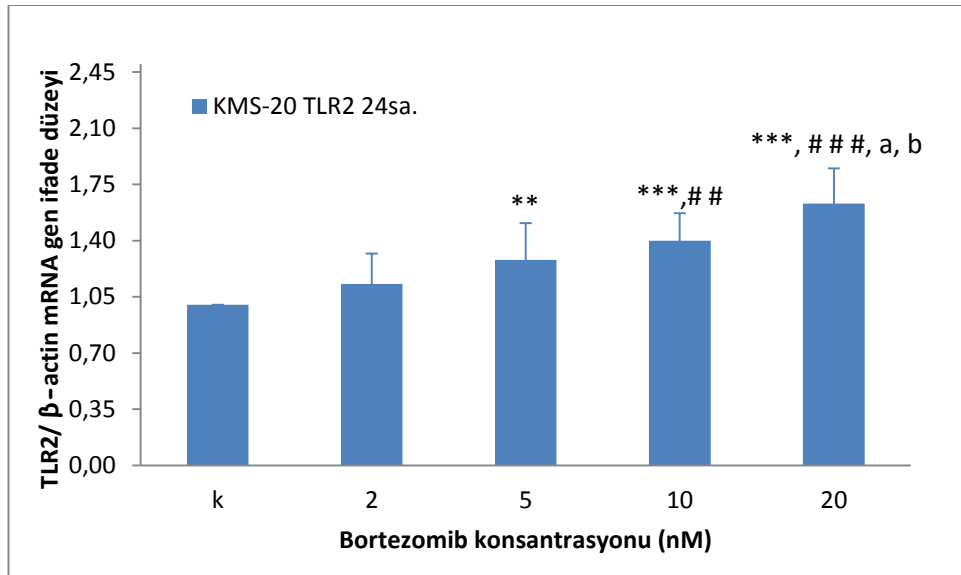
**Çizelge 4.8:** KMS-20 hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR2 gen ifade düzeylerine etkisi.

| KMS-20 TLR2 gen ifade düzeyi |                                 |                                 |                                 |
|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Bortezomib Konsantrasyonları | 12 saatlik RQ ve standart sapma | 24 saatlik RQ ve standart sapma | 48 saatlik RQ ve standart sapma |
| Kontrol                      | 1,00± 0,00                      | 1,00± 0,00                      | 1,00± 0,00                      |
| 2nM                          | 1,18± 0,16                      | 1,13± 0,19                      | 1,02± 0,12                      |
| 5nM                          | 1,42± 0,13                      | 1,28± 0,23                      | 1,46± 0,16                      |
| 10nM                         | 1,77± 0,18                      | 1,40± 0,17                      | 1,96± 0,30                      |
| 20nM                         | 2,46± 0,31                      | 1,63± 0,22                      | 4,22± 0,44                      |



**Şekil 4.13:** KMS-20 hücre hattında 12 saatlik bortezomib uygulamasının TLR2 gen ifade düzeyine etkisi.

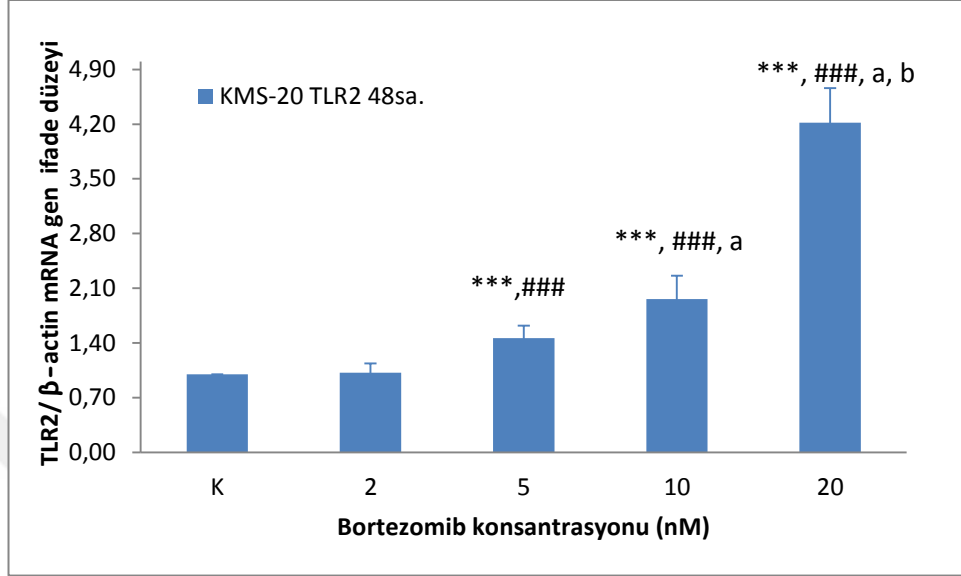
KMS-20 hücre hattına 12 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR2 gen ifade düzeyi 5, 10 ve 20nM’da kontrole göre anlamlı artış gösterdi (\*\*\*P<0.001). Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında 2nM’a göre 5, 10 ve 20nM konsantrasyonlarda anlamlı artış (##P<0.01, ###P<0.001), 5nM’a göre 10 ve 20nM’da anlamlı artış (<sup>a</sup>P<0.001), 10nM’a göre 20nM’da anlamlı artış olduğu gözlemlendi (<sup>b</sup>P<0.001) (Şekil 4. 13).



**Şekil 4.14:** KMS-20 hücre hattında 24 saatlik bortezomib uygulamasının TLR2 gen ifade düzeyine etkisi.

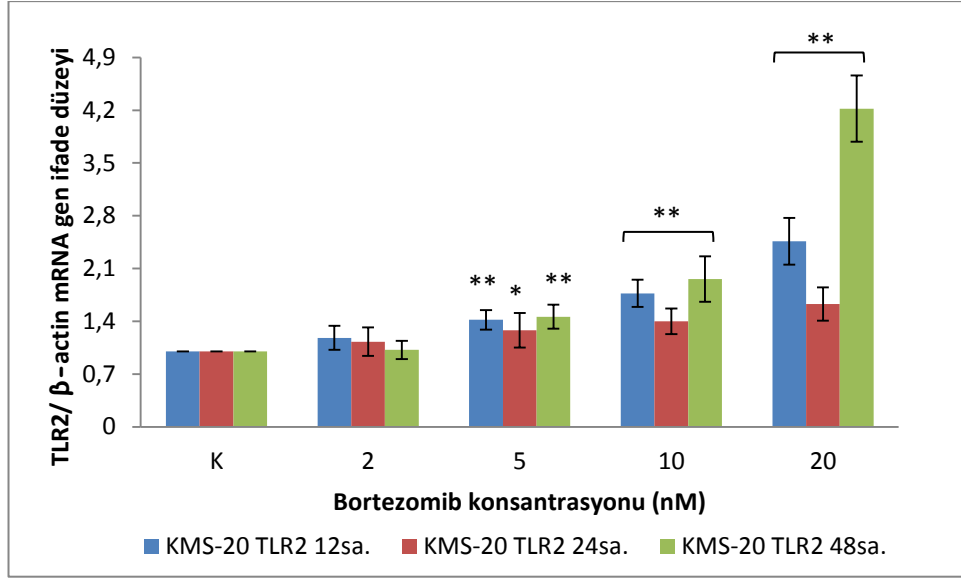
KMS-20 hücre hattına 24 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR2 gen ifade düzeyi 5, 10 ve 20nM’da kontrole göre anlamlı artış gösterdi (\*\*p<0.01,

\*\*\*P<0.001). Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında 2nM'a göre 10 ve 20nM konsantrasyonlarda anlamlı artış (<sup>##</sup>P<0.01, <sup>###</sup>P<0.001), 5nM'a göre 20nM'da anlamlı artış (<sup>a</sup>P<0.001), 10nM'a göre 20nM'da anlamlı artış olduğu gözlemlendi (<sup>b</sup>P<0.01) (Şekil 4. 14).



**Şekil 4.15:** KMS-20 hücre hattında 48 saatlik bortezomib uygulamasının TLR2 gen ifade düzeyine etkisi.

KMS-20 hücre hattına 48 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR2 gen ifade düzeyi 5, 10 ve 20nM'da kontrole göre anlamlı artış gösterdi (\*\*\*P<0.001). Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında 2nM'a göre 5, 10 ve 20nM konsantrasyonlarda anlamlı artış (<sup>###</sup>P<0.001), 5nM'a göre 10 ve 20nM'da anlamlı artış (<sup>a</sup>P<0.001), 10nM'a göre 20nM'da anlamlı artış olduğu gözlemlendi (<sup>b</sup>P<0.001) (Şekil 4. 15).



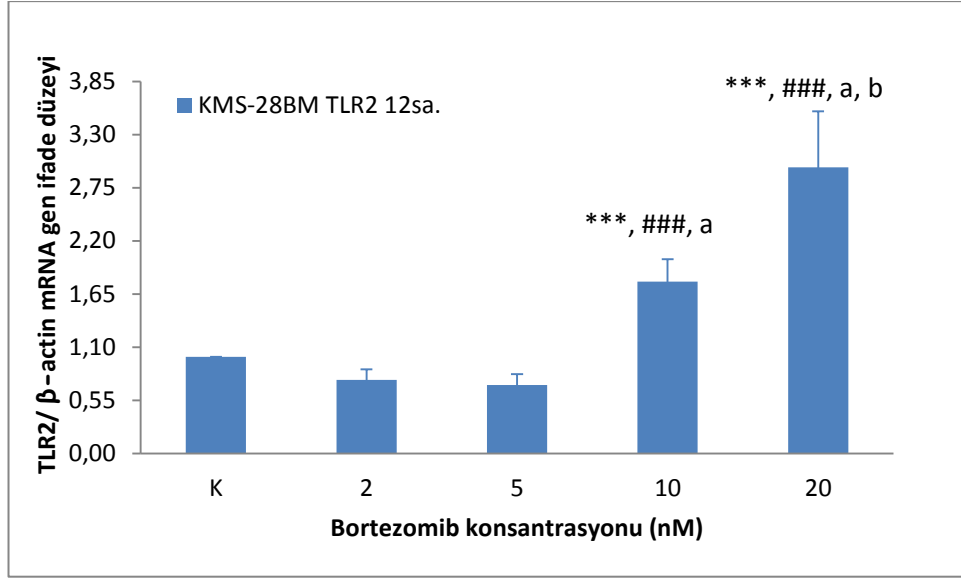
**Şekil 4.16:** KMS-20 hücre hattında 12, 24 ve 48 saatlik bortezomib uygulamasının TLR2 gen ifade düzeyine etkisi.

KMS-20 hücre hattına 12, 24 ve 48 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR2 gen ifade düzeyi 5, 10 ve 20nM'da kontrole göre anlamlı artış gösterdi (\*p<0.01, \*\*P<0.001). Kontrole göre 2nM' da anlamlı bir farklılık saptanamadı (Şekil 4. 16).

#### 4.6.1.2 KMS-28BM hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR2 gen ifade düzeyleri

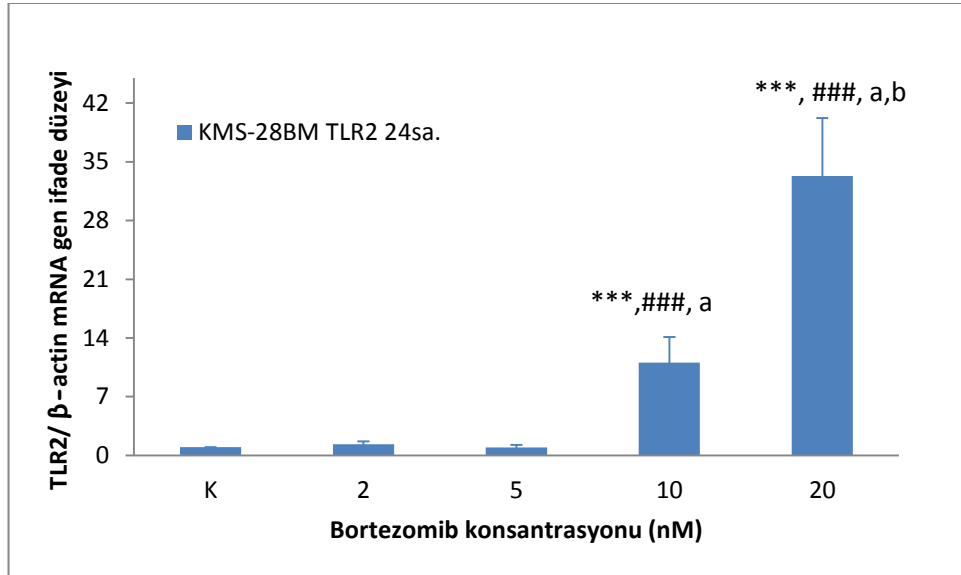
**Çizelge 4.9:** KMS-28BM hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR2 gen ifade düzeylerine etkisi.

| KMS-28BM TLR2 gen ifade düzeyi |                                 |                                 |                                 |
|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Bortezomib Konsantrasyonları   | 12 saatlik RQ ve standart sapma | 24 saatlik RQ ve standart sapma | 48 saatlik RQ ve standart sapma |
| Kontrol                        | 1,00± 0,00                      | 1,00± 0,00                      | 1,00± 0,00                      |
| 2nM                            | 0,76± 0,11                      | 1,33± 0,34                      | 1,03± 0,23                      |
| 5nM                            | 0,71± 0,10                      | 0,94± 0,32                      | 1,36± 0,49                      |
| 10nM                           | 1,78± 0,23                      | 11,08± 3,05                     | 22,93± 5,75                     |
| 20nM                           | 2,96± 0,58                      | 33,3± 6,93                      | 61,8± 14,21                     |



**Şekil 4.17:** KMS-28BM hücre hattında 12 saatlik bortezomib uygulamasının TLR2 gen ifade düzeyine etkisi.

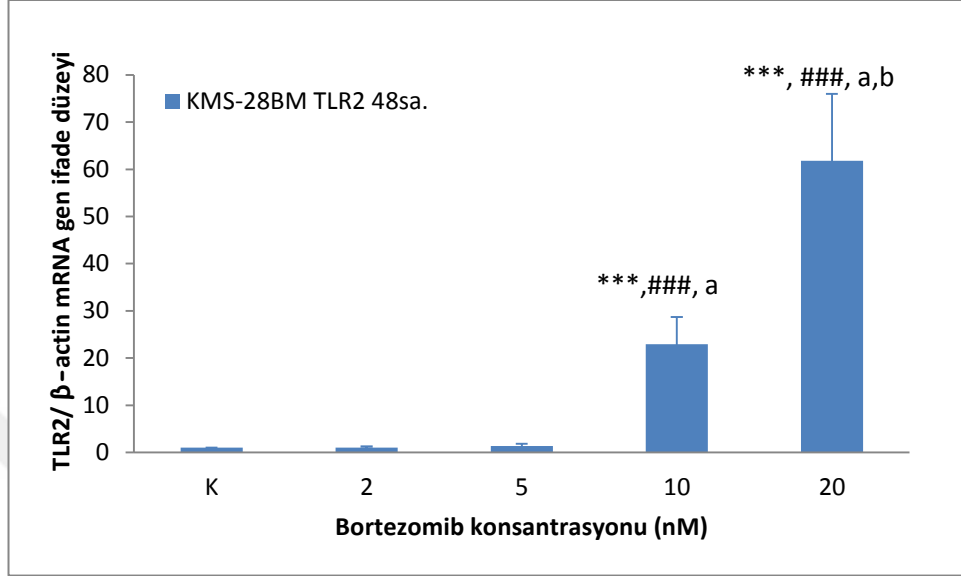
KMS-28BM hücre hattına 12 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR2 gen ifade düzeyi 10 ve 20nM’da kontrole göre anlamlı artış gösterdi ( $***P<0.001$ ). 2 ve 5nM’da kontrole göre anlamlılık saptanamadı. Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında 2nM’a göre 10 ve 20nM konsantrasyonlarda anlamlı artış ( $###P<0.001$ ), 5nM’a göre 10 ve 20nM’da anlamlı artış ( $^aP<0.001$ ), 10nM’a göre 20nM’da anlamlı artış olduğu gözlemlendi ( $^bP<0.001$ ) (Şekil 4. 17).



**Şekil 4.18:** KMS-28BM hücre hattında 24 saatlik bortezomib uygulamasının TLR2 gen ifade düzeyine etkisi.

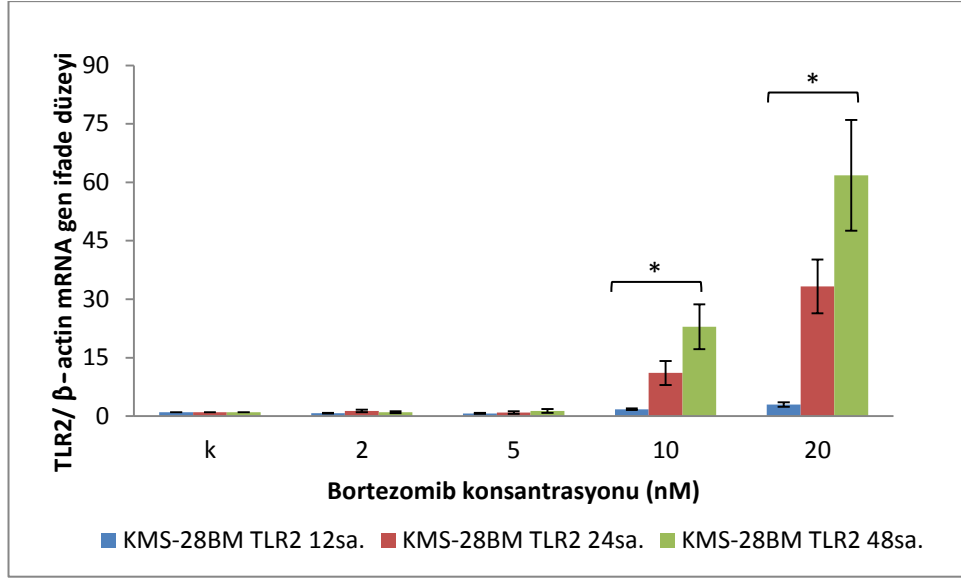
KMS-28BM hücre hattına 24 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR2 gen ifade düzeyi 10 ve 20nM’da kontrole göre anlamlı artış gösterdi ( $***P<0.001$ ). 2 ve

5nM’da kontrole göre anlamlılık saptanamadı. Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında 2nM’a göre 10 ve 20nM konsantrasyonlarda anlamlı artış ( $^{###}P<0.001$ ), 5nM’a göre 10 ve 20nM’da anlamlı artış ( $^aP<0.001$ ), 10nM’a göre 20nM’da anlamlı artış olduğu gözlemlendi ( $^bP<0.001$ ) (Şekil 4. 18).



**Şekil 4.19:** KMS-28BM hücre hattında 48 saatlik bortezomib uygulamasının TLR2 gen ifade düzeyine etkisi.

KMS-28BM hücre hattına 48 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR2 gen ifade düzeyi 10 ve 20nM’da kontrole göre anlamlı artış gösterdi ( $^{***}P<0.001$ ). 2 ve 5nM’da kontrole göre anlamlılık saptanamadı. Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında ise 2nM’a göre 10 ve 20nM konsantrasyonlarda anlamlı artış ( $^{###}P<0.001$ ), 5nM’a göre 10 ve 20nM’da anlamlı artış ( $^aP<0.001$ ), 10nM’a göre 20nM’da anlamlı artış olduğu gözlemlendi ( $^bP<0.001$ ) (Şekil 4. 19).



**Şekil 4.20:** KMS-28BM hücre hattında 12, 24, 48 saatlik bortezomib uygulamasının TLR2 gen ifade düzeyine etkisi.

KMS-28BM hücre hattına 12, 24 ve 48 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR2 gen ifade düzeyi 10 ve 20nM’da kontrole göre anlamlı artış gösterdi (\*P<0.001). 2 ve 5nM’da ise kontrole göre anlamlılık görülmedi (Şekil 4. 20).

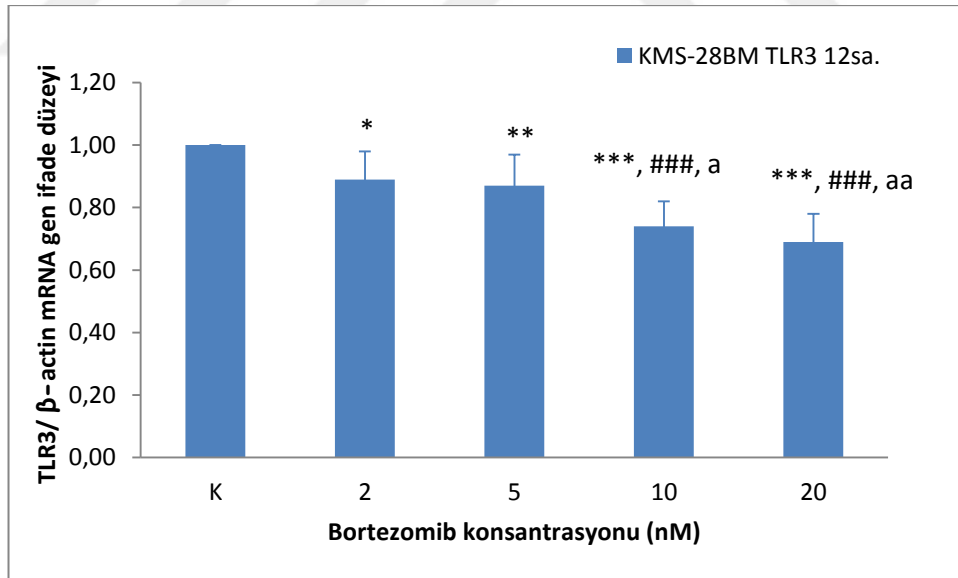
#### 4.6.2 TLR3 gen ifade düzeyleri

KMS-28BM hücre hattında farklı bortezomib konsantrasyonlarının 12, 24 ve 48 saatlik uygulanmasından sonra elde edilen TLR3 mRNA gen ifade düzeyleri kantitatif real time RT-PCR (qRT-PCR) yöntemi kullanılarak saptanmıştır. Her genin kontrol grubuna göre gen ifade düzeyindeki katlık değişim (Relative kantitasyon (RQ))  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  değerleri hesaplanmıştır. KMS-28BM hücre hattındaki TLR3 gen ifadesinin doz ve zamana bağlı RQ ve standart sapma değerleri çizelge 4.10’da verilmiştir. KMS-20 hücre hattında TLR3 gen ifadesi saptanamazken, KMS-28BM hücre hattında 12, 24 ve 48 saatlik TLR3 gen ifade düzeyleri şekil 4.21, 4. 22, 4.23’ te verilmiştir.

#### 4.6.2.1 KMS-28BM hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR3 gen ifade düzeyleri

**Çizelge 4.10:** KMS-28BM hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR3 gen ifade düzeylerine etkisi.

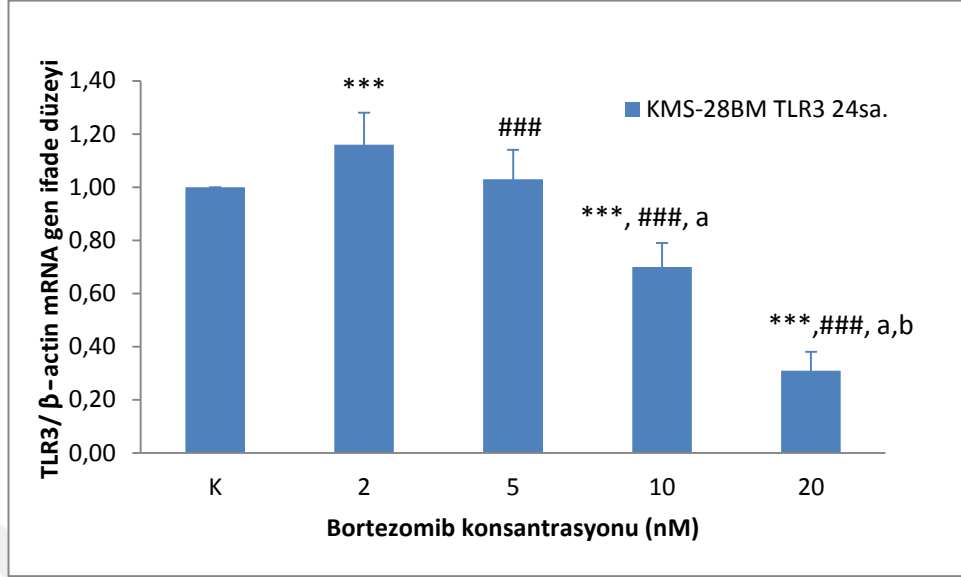
| KMS-28BM TLR3 gen ifade düzeyi |                                 |                                 |                                 |
|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Bortezomib Konsantrasyonları   | 12 saatlik RQ ve standart sapma | 24 saatlik RQ ve standart sapma | 48 saatlik RQ ve standart sapma |
| Kontrol                        | 1,00± 0,00                      | 1,00± 0,00                      | 1,00± 0,00                      |
| 2nM                            | 0,89± 0,09                      | 1,16± 0,12                      | 1,01± 0,09                      |
| 5nM                            | 0,87± 0,10                      | 1,03± 0,11                      | 0,64± 0,10                      |
| 10nM                           | 0,74± 0,08                      | 0,70± 0,09                      |                                 |
| 20nM                           | 0,69± 0,09                      | 0,31± 0,07                      |                                 |



**Şekil 4.21:** KMS-28BM hücre hattında 12 saatlik bortezomib uygulamasının TLR3 gen ifade düzeyine etkisi.

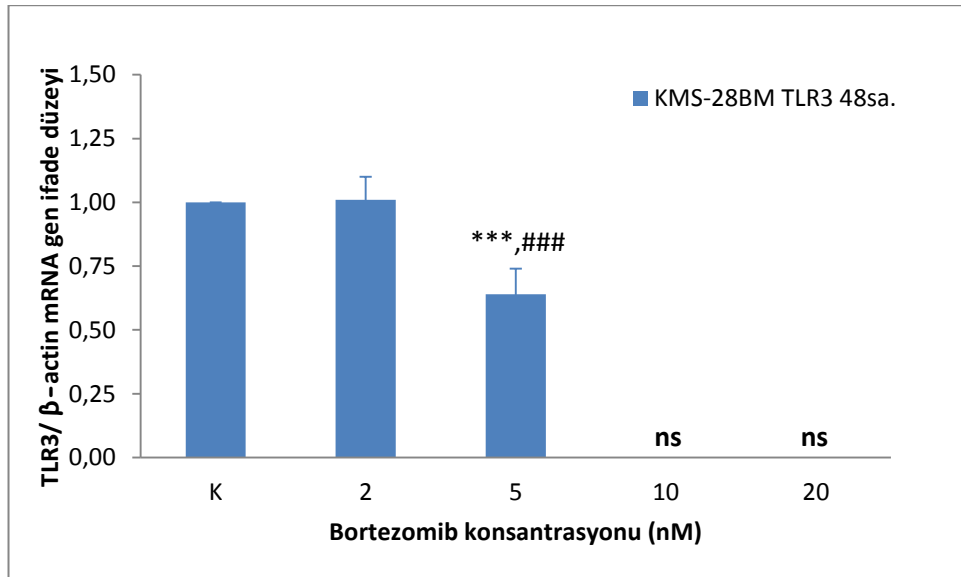
KMS-28BM hücre hattına 12 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR3 gen ifade düzeyi 2, 5, 10 ve 20nM’da kontrole göre anlamlı azalış gösterdi (\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001). Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında 2nM’a göre 10 ve 20nM konsantrasyonlarda anlamlı azalış (###P<0.001), 5nM’a göre 10 ve 20nM’da

anlamli azaliş (<sup>aa</sup>P<0.01, <sup>a</sup>P<0.001) gösterirken 10nM’a göre 20nM’da anlamli bir fark görülmedi (şekil 4. 21).



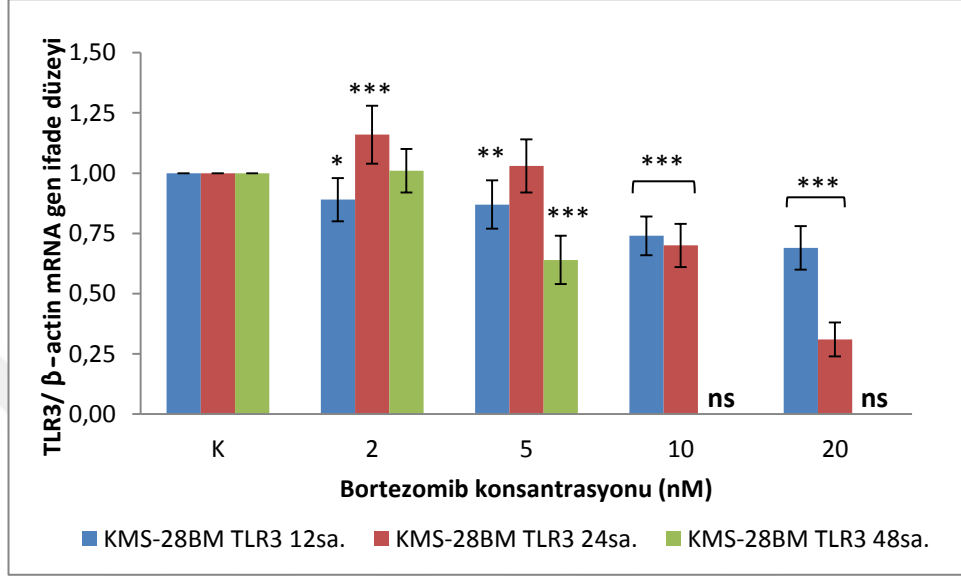
**şekil 4.22:** KMS-28BM hücre hattında 24 saatlik bortezomib uygulamasının TLR3 gen ifade düzeyine etkisi.

KMS-28BM hücre hattına 24 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR3 gen ifade düzeyi 2, 10 ve 20nM’da kontrole göre anlamli azaliş gösterdi (<sup>\*\*\*</sup>P<0.001). Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında 2nM’a göre 5, 10 ve 20nM konsantrasyonlarda anlamli azaliş (<sup>###</sup>P<0.001), 5nM’a göre 10 ve 20nM’da anlamli azaliş (<sup>a</sup>P<0.001), 10nM’a göre 20nM’da anlamli azaliş gözlemlendi (<sup>b</sup>P<0.001) (şekil 4. 22).



**şekil 4.23:** KMS-28BM hücre hattında 48 saatlik bortezomib uygulamasının TLR3 gen ifade düzeyine etkisi.

KMS-28BM hücre hattına 48 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR3 gen ifade düzeyi 5nM’da kontrole göre anlamlı azalış gösterdi ( $***P<0.001$ ). Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında 2nM’a göre 5nM’da anlamlı azalış ( $^{###}P<0.001$ ) gözlemlendi. 10 ve 20nM’da kontrole göre ve konsantrasyonlar arasında anlamlılık saptanamadı (Şekil 4. 23).



**Şekil 4.24:** KMS-28BM hücre hattında 12, 24 ve 48 saatlik bortezomib uygulamasının TLR3 gen ifade düzeyine etkisi.

KMS-28BM hücre hattına 12, 24 ve 48 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR3 gen ifade düzeyi 12 saatin tüm konsantrasyonlarında anlamlı azalış gösterdi ( $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$ ). 24 saatte 2nM’da kontrole göre anlamlı artış gösterirken ( $***P<0.001$ ), 10 ve 20nM konsantrasyonlarda anlamlı azalış gösterdi ( $***P<0.001$ ). 48 saatte ise 5nM’da anlamlı azalış gösterirken ( $***P<0.001$ ), 10 ve 20nM’da anlamlılık saptanamadı (Şekil 4. 24).

#### 4.6.3 TLR4 gen ifade düzeyleri

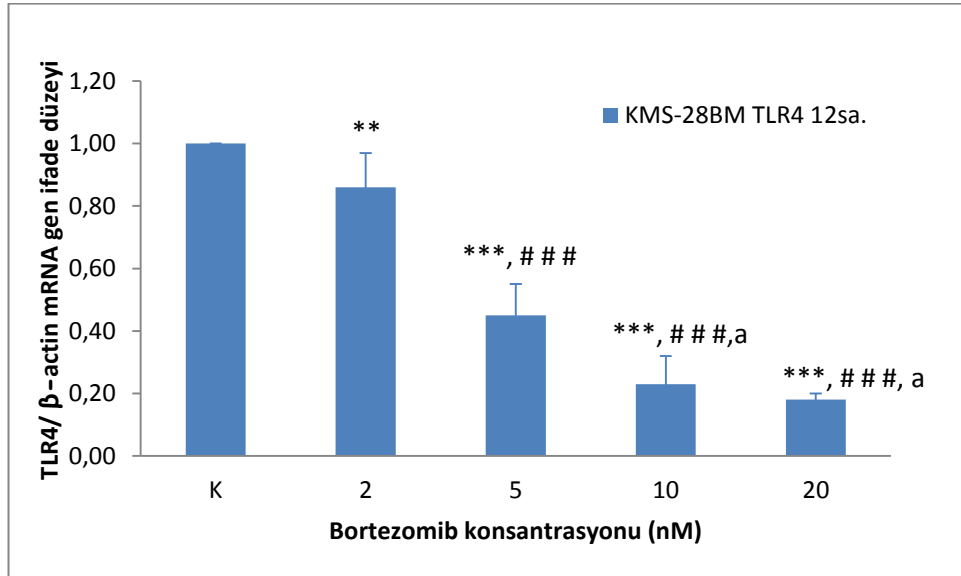
KMS-28BM hücre hattında farklı bortezomib konsantrasyonlarının 12, 24 ve 48 saatlik uygulanmasından sonra elde edilen TLR4 mRNA gen ifade düzeyleri kantitatif real time RT-PCR (qRT-PCR) yöntemi kullanılarak saptanmıştır. Her genin kontrol grubuna göre gen ifade düzeyindeki katlık değişim (Relative kantitasyon (RQ))  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri hesaplanmıştır. KMS-28BM hücre hattındaki TLR4 gen ifadesinin doz ve zamana bağlı RQ ve standart sapma değerleri çizelge 4.11’da verilmiştir. KMS-20 hücre hattında TLR4 gen ifadesi saptanamamıştır. KMS-28BM

hücre hattında 12, 24 ve 48 saatlik TLR4 gen ifade düzeyleri şekil 4.25, 4.26, 4.27’de verilmiştir.

#### 4.6.3.1 KMS-28BM hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR4 gen ifade düzeyleri

**Çizelge 4.11:** KMS-28BM hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR4 gen ifade düzeylerine etkisi.

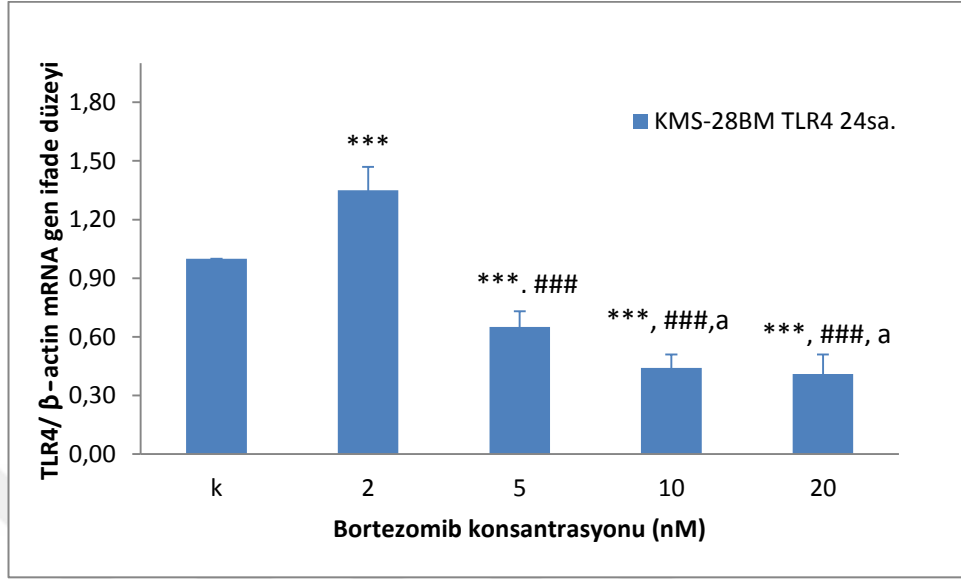
| KMS-28BM TLR4 gen ifade düzeyi |                                 |                                 |                                 |
|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Bortezomib Konsantrasyonları   | 12 saatlik RQ ve standart sapma | 24 saatlik RQ ve standart sapma | 48 saatlik RQ ve standart sapma |
| Kontrol                        | 1,00± 0,00                      | 1,00± 0,00                      | 1,00± 0,00                      |
| 2nM                            | 0,86± 0,11                      | 1,35± 0,12                      | 1,27± 0,13                      |
| 5nM                            | 0,45± 0,10                      | 0,65± 0,08                      | 0,63± 0,15                      |
| 10nM                           | 0,23± 0,09                      | 0,44± 0,07                      | 0,21± 0,07                      |
| 20nM                           | 0,18± 0,02                      | 0,41± 0,10                      | 0,17± 0,05                      |



**Şekil 4.25:** KMS-28BM hücre hattında 12 saatlik bortezomib uygulamasının TLR4 gen ifade düzeyine etkisi.

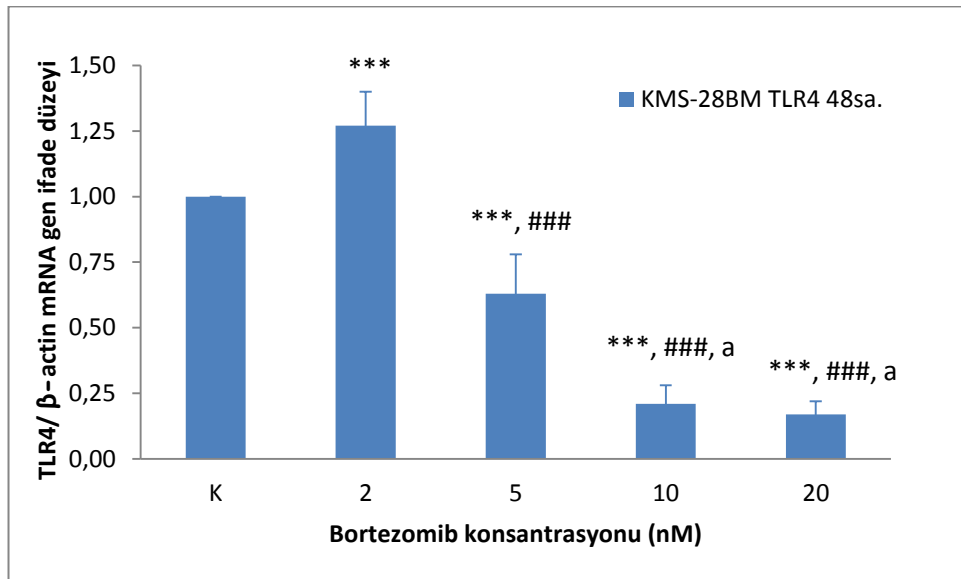
KMS-28BM hücre hattına 12 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR4 gen ifade düzeyi 2, 5, 10 ve 20nM’da kontrole göre anlamlı azalış gösterdi (\*\*P<0.01,

\*\*\*P<0.001). Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında 2nM'a göre 5, 10 ve 20nM konsantrasyonlarda anlamlı azalış (###P<0.001), 5nM'a göre 10 ve 20nM'da anlamlı azalış gözlemlendi (<sup>a</sup>P<0.001) (Şekil 4. 25).



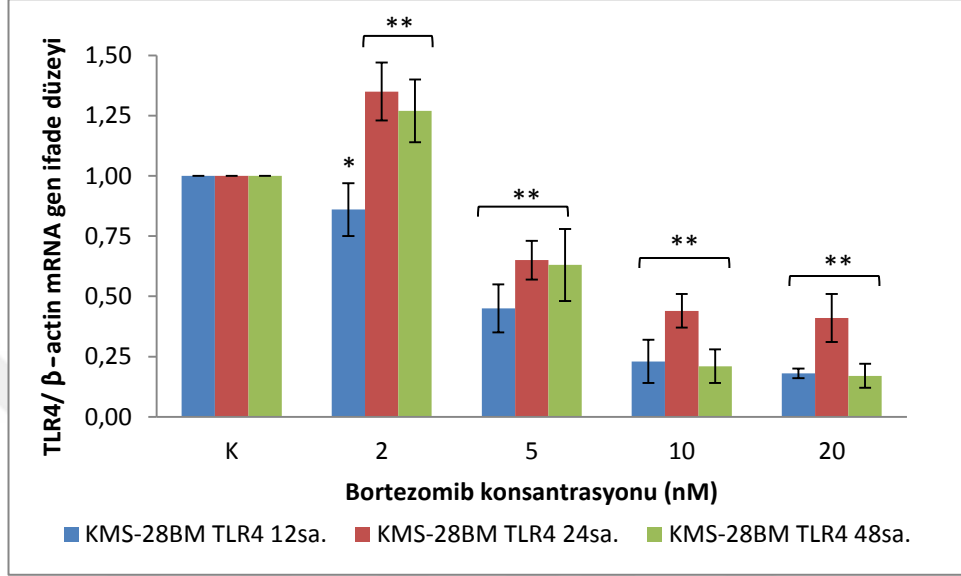
**Şekil 4.26:** KMS-28BM hücre hattında 24 saatlik bortezomib uygulamasının TLR4 gen ifade düzeyine etkisi.

KMS-28BM hücre hattına 24 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR4 gen ifade düzeyi 2, 5, 10 ve 20nM'da kontrole göre anlamlı azalış gösterdi (\*\*\*P<0.001). Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında 2nM'a göre 5, 10 ve 20nM konsantrasyonlarda anlamlı azalış (###P<0.001), 5nM'a göre 10 ve 20nM'da anlamlı azalış gözlemlendi (<sup>a</sup>P<0.001) (Şekil 4. 26).



**Şekil 4.27:** KMS-28BM hücre hattında 48 saatlik bortezomib uygulamasının TLR4 gen ifade düzeyine etkisi.

KMS-28BM hücre hattına 48 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR4 gen ifade düzeyi 2, 5, 10 ve 20nM’da kontrole göre anlamlı azalış gösterdi (\*\*\*P<0.001). Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında 2nM’a göre 5, 10 ve 20nM konsantrasyonlarda anlamlı azalış (###P<0.001), 5nM’a göre 10 ve 20nM’da anlamlı azalış gözlemlendi (<sup>a</sup>P<0.001) (Şekil 4. 27).



**Şekil 4.28:** KMS-28BM hücre hattında 12, 24, 48 saatlik bortezomib uygulamasının TLR4 gen ifade düzeyine etkisi.

KMS-28BM hücre hattına 12, 24 ve 48 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR4 gen ifade düzeyi 12 saattin tüm konsantrasyonlarında kontrole göre anlamlı azalış gösterdi (\*P<0.01, \*P<0.001). 24 ve 48 saatte 2nM’da kontrole göre anlamlı artış görülürken 5, 10 ve 20nM’da anlamlı azalış gözlemlendi (\*P<0.01, \*P<0.001) (Şekil 4. 28).

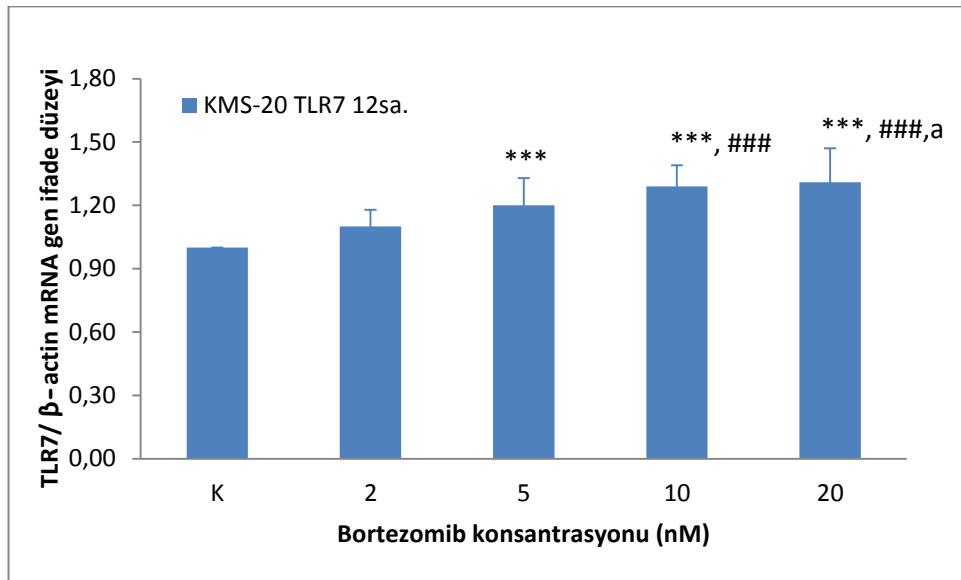
#### 4.6.4 TLR7 gen ifade düzeyleri

KMS-20 ve KMS-28BM hücre hattında farklı bortezomib konsantrasyonlarının 12, 24 ve 48 saatlik uygulanmasından sonra elde edilen TLR7 mRNA gen ifade düzeyleri kantitatif real time RT-PCR (qRT-PCR) yöntemi kullanılarak saptanmıştır. Her genin kontrol grubuna göre gen ifade düzeyindeki katlık değişim (Relative kantitasyon (RQ))  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri hesaplanmıştır. KMS-20 ve KMS-28BM hücre hatlarındaki TLR7 gen ifadesinin doz ve zamana bağlı RQ ve standart sapma değerleri çizelge 4.12 ve 4.13’te verilmiştir. KMS-20 hücre hattında 12, 24 ve 48 saatlik TLR7 gen ifade düzeyleri şekil 4.29, 4.30, 4.31’de, KMS-28BM hücre hattında TLR7 gen ifade düzeyi şekil 4.32, 4.33, 4.34’te verilmiştir.

#### 4.6.4.1 KMS-20 hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR7 gen ifade düzeyleri

**Çizelge 4.12:** KMS-20 hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR7 gen ifade düzeylerine etkisi.

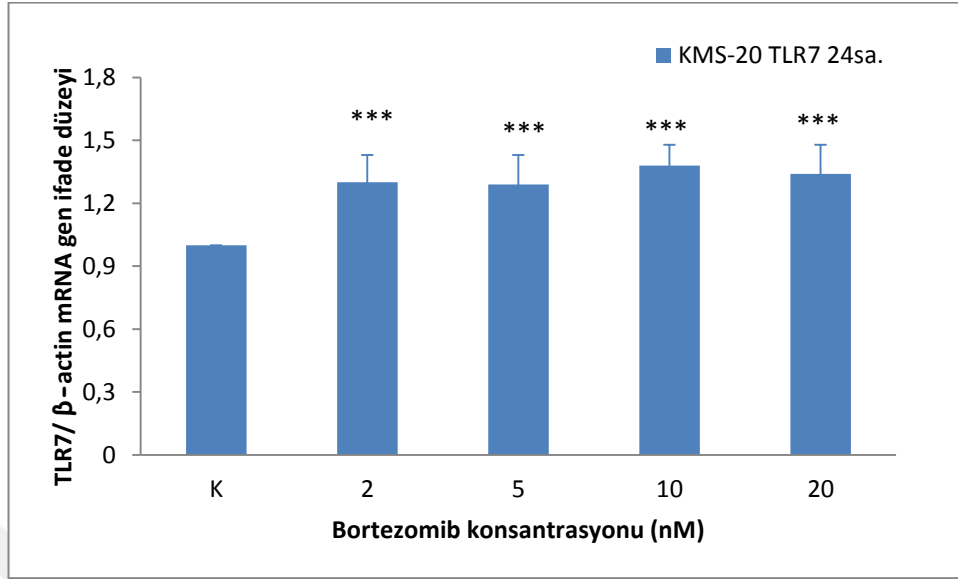
| KMS-20 TLR7 gen ifade düzeyi |                                 |                                 |                                 |
|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Bortezomib Konsantrasyonları | 12 saatlik RQ ve standart sapma | 24 saatlik RQ ve standart sapma | 48 saatlik RQ ve standart sapma |
| Kontrol                      | 1,00± 0,00                      | 1,00± 0,00                      | 1,00± 0,00                      |
| 2nM                          | 1,10± 0,08                      | 1,30± 0,13                      | 1,42± 0,10                      |
| 5nM                          | 1,20± 0,13                      | 1,29± 0,14                      | 1,44± 0,19                      |
| 10nM                         | 1,29± 0,10                      | 1,38± 0,10                      | 1,48± 0,14                      |
| 20nM                         | 1,31± 0,16                      | 1,34± 0,14                      | 1,54± 0,21                      |



**Şekil 4.29:** KMS-20 hücre hattında 12 saatlik bortezomib uygulamasının TLR7 gen ifade düzeyine etkisi.

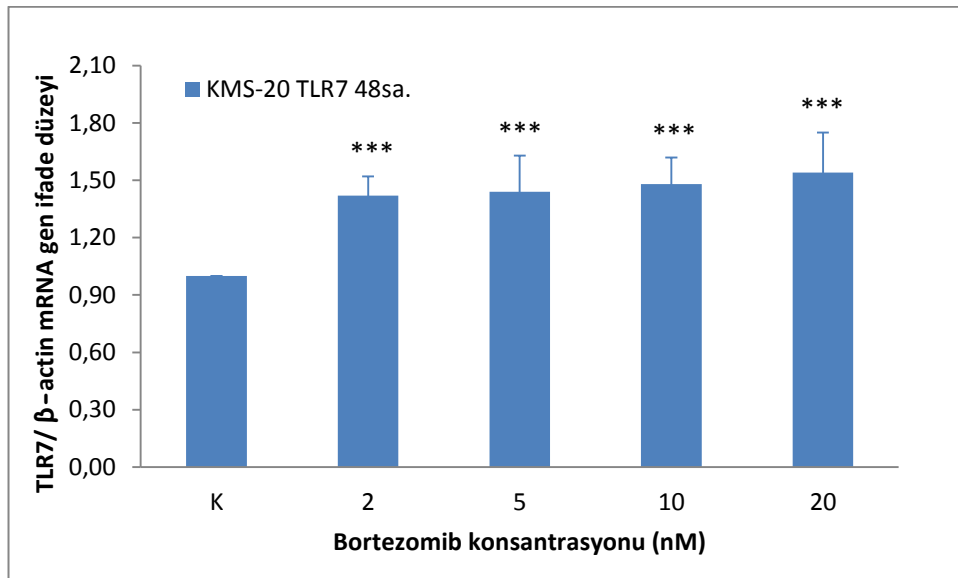
KMS-20 hücre hattına 12 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR7 gen ifade düzeyi 5, 10 ve 20nM’da kontrole göre anlamlı artış gösterdi (\*\*\*P<0.001). Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında 2nM’a göre 10 ve 20nM konsantrasyonlarda

anlamli artış ( $^{###}P<0.001$ ), 5nM'a göre 20nM'da anlamli artış gözlemlendi ( $^aP<0.001$ ) (Şekil 4. 29).



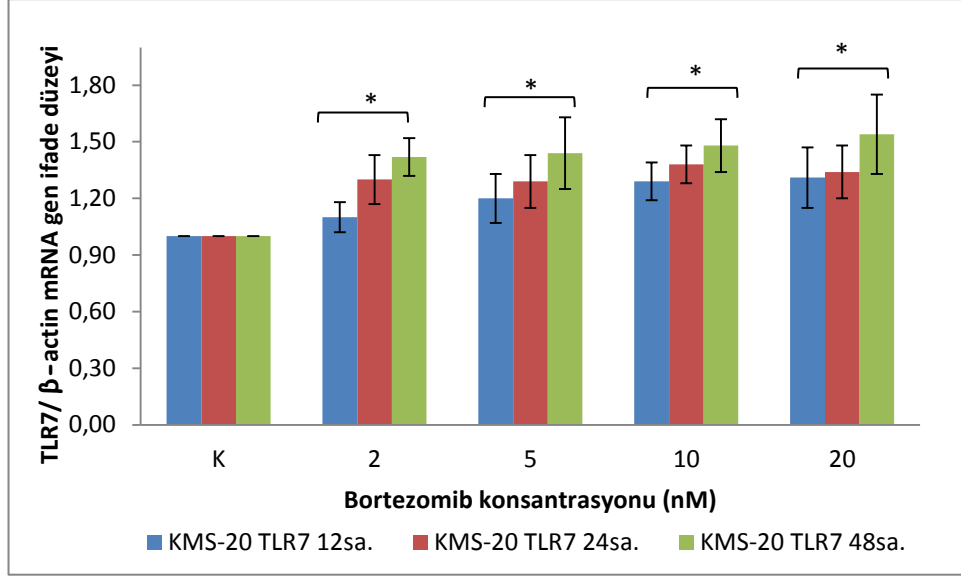
Şekil 4.30: KMS-20 hücre hattında 24 saatlik bortezomib uygulamasının TLR7 gen ifade düzeyine etkisi.

KMS-20 hücre hattına 24 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR7 gen ifade düzeyi 2, 5, 10 ve 20nM'da kontrole göre anlamli artış gösterdi ( $^{***}P<0.001$ ). Konsantrasyonlar arasında anlamli bir farklılık saptanmadı (Şekil 4. 30).



Şekil 4.31: KMS-20 hücre hattında 48 saatlik bortezomib uygulamasının TLR7 gen ifade düzeyine etkisi.

KMS-20 hücre hattına 48 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR7 gen ifade düzeyi 2, 5, 10 ve 20nM'da kontrole göre anlamli artış gösterdi ( $^{***}P<0.001$ ). Konsantrasyonlar arasında anlamli bir farklılık saptanmadı (Şekil 4. 31).



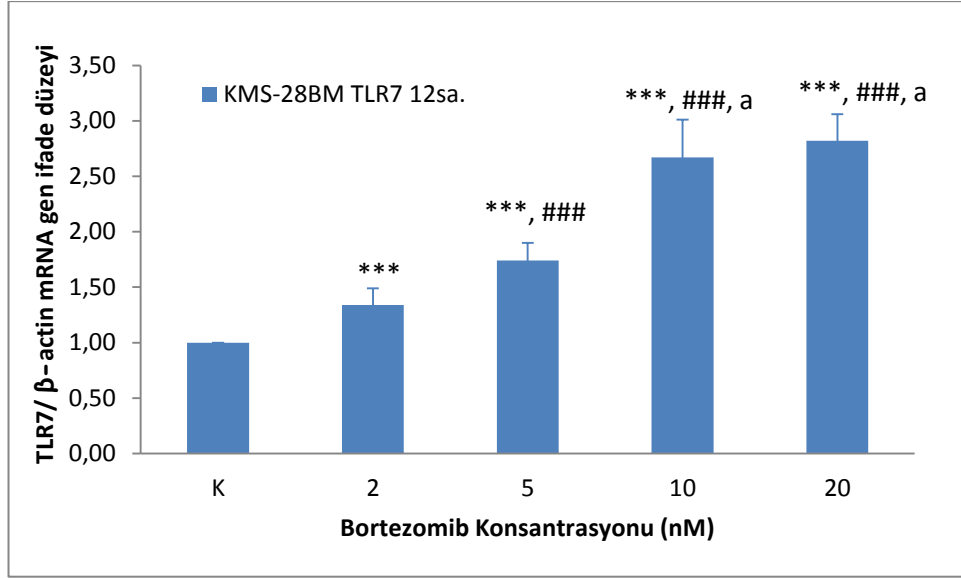
**Şekil 4.32:** KMS-20 hücre hattında 12, 24, 48 saatlik bortezomib uygulamasının TLR7 gen ifade düzeyine etkisi.

KMS-20 hücre hattına 12, 24 ve 48 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR7 gen ifade düzeyi 2, 5, 10 ve 20nM’da kontrole göre anlamlı artış gösterdi (\*P<0.001) (Şekil 4. 32).

#### 4.6.4.2 KMS-28BM hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR7 gen ifade düzeyleri

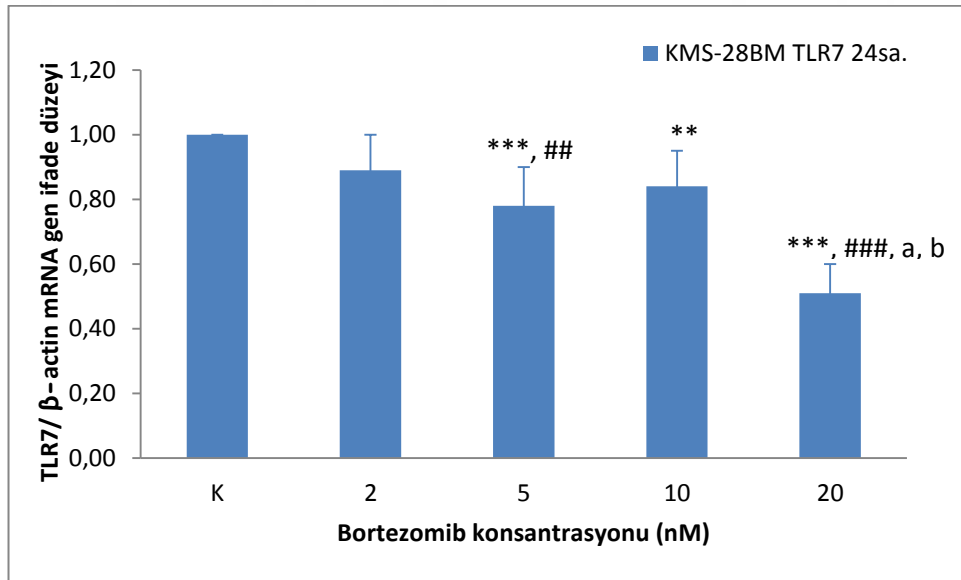
**Çizelge 4.13:** KMS-28BM hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR7 gen ifade düzeylerine etkisi.

| KMS-28BM TLR7 gen ifade düzeyi |                                 |                                 |                                 |
|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Bortezomib Konsantrasyonları   | 12 saatlik RQ ve standart sapma | 24 saatlik RQ ve standart sapma | 48 saatlik RQ ve standart sapma |
| Kontrol                        | 1,00± 0,00                      | 1,00± 0,00                      | 1,00± 0,00                      |
| 2nM                            | 1,34± 0,15                      | 0,89± 0,11                      | 0,70± 0,08                      |
| 5nM                            | 1,74± 0,16                      | 0,78± 0,12                      | 0,29± 0,05                      |
| 10nM                           | 2,67± 0,34                      | 0,84± 0,11                      | 0,29± 0,02                      |
| 20nM                           | 2,82± 0,24                      | 0,51± 0,09                      | 0,19± 0,01                      |



**Şekil 4.33:** KMS-28BM hücre hattında 12 saatlik bortezomib uygulamasının TLR7 gen ifade düzeyine etkisi.

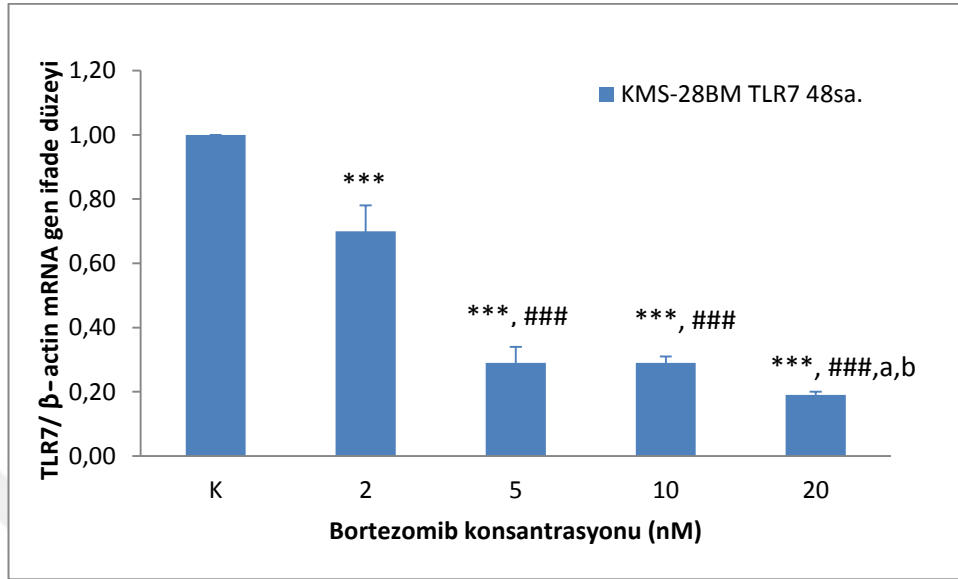
KMS-28BM hücre hattına 12 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR7 gen ifade düzeyi 2, 5, 10 ve 20nM’da kontrole göre anlamlı artış gösterdi (\*\*\*P<0.001). Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında 2nM’a göre 5, 10 ve 20nM konsantrasyonlarda anlamlı artış (###P<0.001), 5nM’a göre 10 ve 20nM’da anlamlı artış gözlemlendi (<sup>a</sup>P<0.001) (Şekil 4. 33).



**Şekil 4.34:** KMS-28BM hücre hattında 24 saatlik bortezomib uygulamasının TLR7 gen ifade düzeyine etkisi.

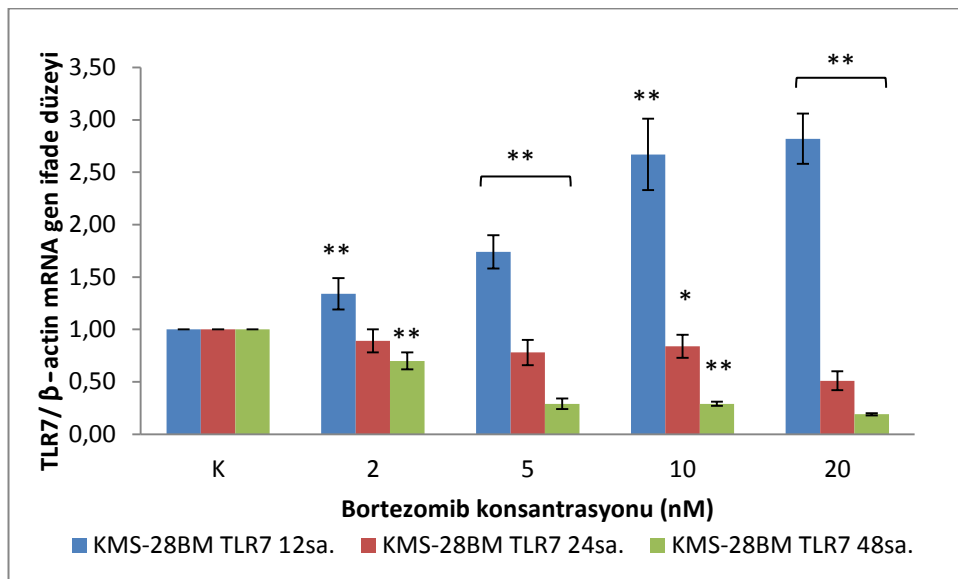
KMS-28BM hücre hattına 24 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR7 gen ifade düzeyi 5, 10 ve 20nM’da kontrole göre anlamlı azalış gösterdi (\*\*P<0.01,\*\*\*P<0.001). Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında 2nM’a göre 5 ve

20nM konsantrasyonlarda anlamlı azalış ( $^{##}P<0.01$   $^{###}P<0.001$ ), 5nM'a göre 20nM'da anlamlı azalış ( $^aP<0.001$ ) gösterirken 10nM'a göre 20nM'da anlamlı azalış gözlemlendi ( $^bP<0.001$ ) (Şekil 4. 34).



**Şekil 4.35:** KMS-28BM hücre hattında 48 saatlik bortezomib uygulamasının TLR7 gen ifade düzeyine etkisi.

KMS-28BM hücre hattına 48 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR7 gen ifade düzeyi 2, 5, 10 ve 20nM'da kontrole göre anlamlı azalış gösterdi ( $^{***}P<0.001$ ). Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında 2nM'a göre 5, 10 ve 20nM konsantrasyonlarda anlamlı azalış ( $^{###}P<0.001$ ), 5nM'a göre 20nM'da anlamlı azalış ( $^aP<0.001$ ), 10nM'a göre 20nM'da anlamlı azalış gözlemlendi ( $^bP<0.001$ ) (Şekil 4. 35).



**Şekil 4.36:** KMS-28BM hücre hattında 12, 24, 48 saatlik bortezomib uygulamasının TLR7 gen ifade düzeyine etkisi.

KMS-28BM hücre hattına 12, 24 ve 48 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR7 gen ifade düzeyi 12saatte tüm konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı artış gösterdi (\*\*P<0.001). 24 saatte 5, 10 ve 20nM’da kontrole göre anlamlı azalış (\*P<0.01 \*\*P<0.001), 48 saatte ise tüm konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı azalış gözlemlendi (\*\*P<0.001) (Şekil 4. 36).

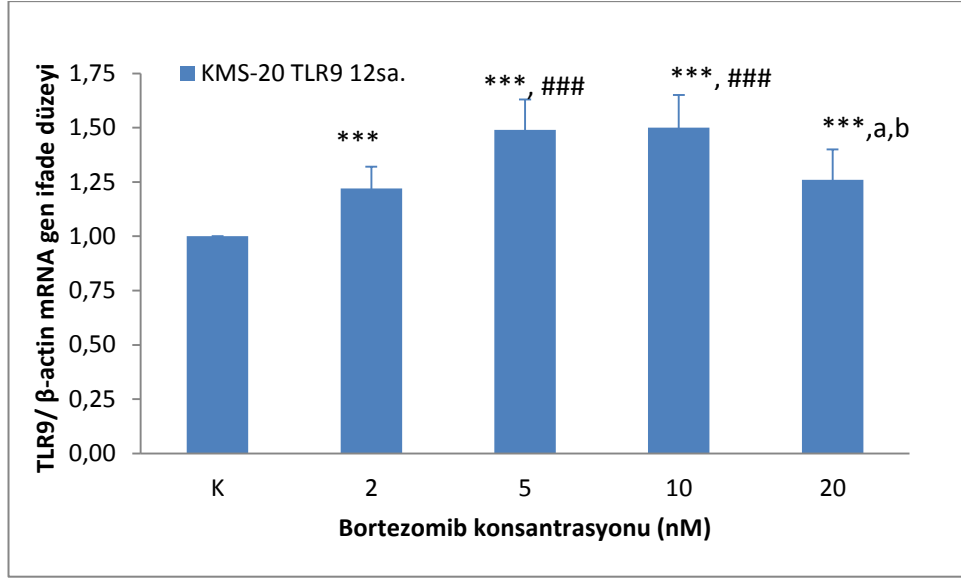
#### 4.6.5 TLR9 gen ifade düzeyleri

KMS-20 ve KMS-28BM hücre hattında farklı bortezomib konsantrasyonlarının 12, 24 ve 48 saatlik uygulanmasından sonra elde edilen TLR9 mRNA gen ifade düzeyleri kantitatif real time RT-PCR (qRT-PCR) yöntemi kullanılarak saptanmıştır. Her genin kontrol grubuna göre gen ifade düzeyindeki katlık değişim (Relative kantitasyon (RQ))  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  değerleri hesaplanmıştır. KMS-20 ve KMS-28BM hücre hatlarındaki TLR9 gen ifadesinin doz ve zamana bağlı RQ ve standart sapma değerleri çizelge 4.14 ve 4.15’te verilmiştir. KMS-20 hücre hattında 12, 24 ve 48 saatlik TLR9 gen ifade düzeyleri şekil 4. 37, 4.38, 4.39’da, KMS-28BM hücre hattında TLR9 gen ifade düzeyleri 4.40, 4.41, 4.42’ de verilmiştir.

##### 4.6.5.1 KMS-20 hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR9 gen ifade düzeyleri

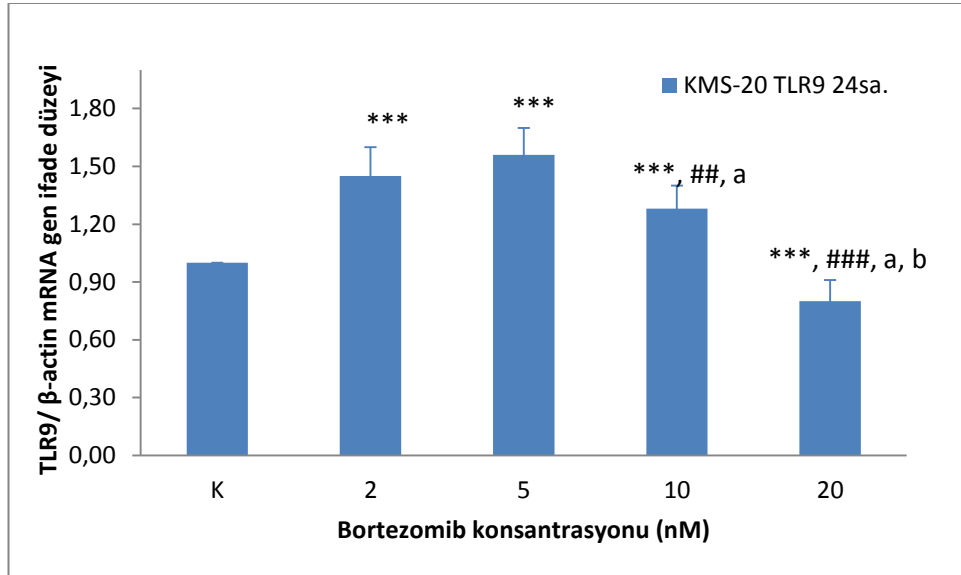
**Çizelge 4.14:** KMS-20 hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR9 gen ifade düzeylerine etkisi.

| KMS-20 TLR9 gen ifade düzeyi    |                                    |                                    |                                    |
|---------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Bortezomib<br>Konsantrasyonları | 12 saatlik RQ ve<br>standart sapma | 24 saatlik RQ ve<br>standart sapma | 48 saatlik RQ ve<br>standart sapma |
| Kontrol                         | 1,00± 0,00                         | 1,00± 0,00                         | 1,00± 0,00                         |
| 2nM                             | 1,22± 0,10                         | 1,45± 0,15                         | 1,78± 0,12                         |
| 5nM                             | 1,49± 0,14                         | 1,56± 0,14                         | 1,86± 0,12                         |
| 10nM                            | 1,50± 0,15                         | 1,28± 0,12                         | 0,80± 0,08                         |
| 20nM                            | 1,26± 0,14                         | 0,80± 0,11                         | 0,55± 0,09                         |



**Şekil 4.37:** KMS-20 hücre hattında 12 saatlik bortezomib uygulamasının TLR9 gen ifade düzeyine etkisi.

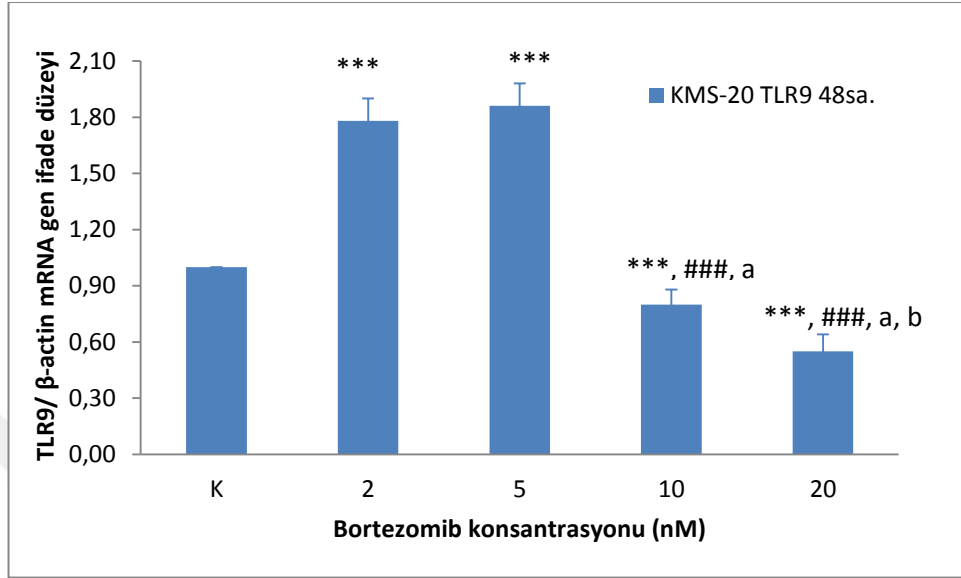
KMS-20 hücre hattına 12 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR9 gen ifade düzeyi 2, 5 ve 10nM’da kontrole göre anlamlı artış gösterirken 20nM’da kontrole göre anlamlı azalış gösterdi ( $***P<0.001$ ). Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında 2nM’a göre 5 ve 10nM’da anlamlı artış gözlemlendi ( $###P<0.001$ ). 5nM’ da 20nM’a göre anlamlı azalış ( $^aP<0.001$ ), 10nM’a göre ise 20nM’da anlamlı azalış gözlemlendi ( $^bP<0.001$ ) (Şekil 4. 37).



**Şekil 4.38:** KMS-20 hücre hattında 24 saatlik bortezomib uygulamasının TLR9 gen ifade düzeyine etkisi.

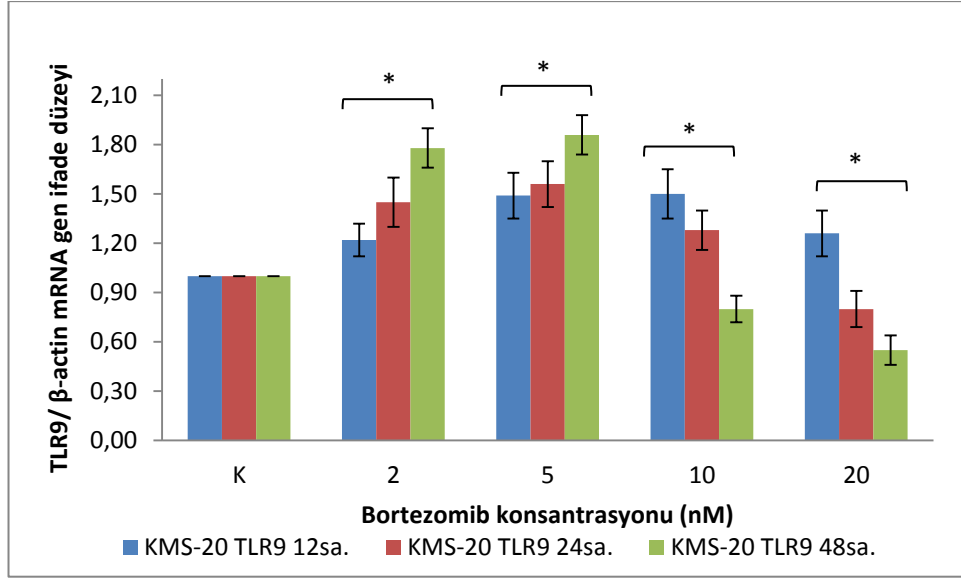
KMS-20 hücre hattına 24 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR9 gen ifade düzeyi 2, 5, 10nM’da kontrole göre anlamlı artış gösterirken 20nM’da kontrole

göre anlamlı azalış gösterdi ( $***P<0.001$ ). Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında 2nM'a göre 10 ve 20nM'da anlamlı azalış gözlemlendi ( $^{##}P<0.01$ ,  $^{###}P<0.001$ ). 5nM'a göre 10 ve 20nM'da anlamlı azalış ( $^aP<0.001$ ), 10nM'a göre ise 20nM'da anlamlı azalış gözlemlendi ( $^bP<0.001$ ) (Şekil 4. 38).



**Şekil 4.39:** KMS-20 hücre hattında 48 saatlik bortezomib uygulamasının TLR9 gen ifade düzeyine etkisi.

KMS-20 hücre hattına 48 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR9 gen ifade düzeyi 2 ve 5nM'da kontrole göre anlamlı artış gösterirken 10 ve 20nM'da kontrole göre anlamlı azalış gösterdi ( $***P<0.001$ ). Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında 2nM'a göre 10 ve 20nM'da anlamlı azalış gözlemlendi ( $^{###}P<0.001$ ). 5nM'a göre 10 ve 20nM'da anlamlı azalış ( $^aP<0.001$ ), 10nM'a göre ise 20nM'da anlamlı azalış gözlemlendi ( $^bP<0.001$ ) (Şekil 4. 39).



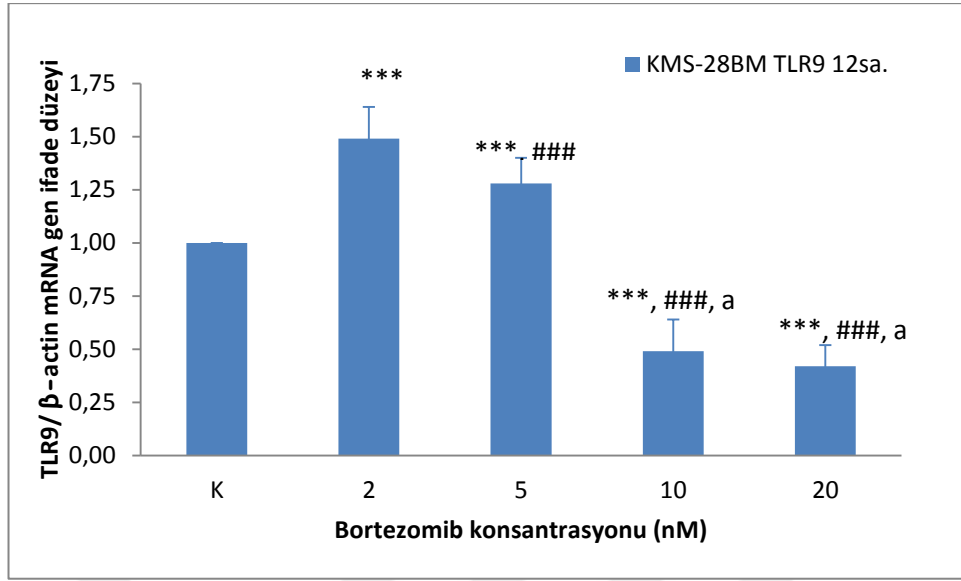
**Şekil 4.40:** KMS-20 hücre hattında 12, 24, 48 saatlik bortezomib uygulamasının TLR9 gen ifade düzeyine etkisi.

KMS-20 hücre hattına 12, 24 ve 48 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR9 gen ifade düzeyi 12 ve 24 saatte 2, 5 ve 10nM’da kontrole göre anlamlı artış gösterirken 20nM’da kontrole göre anlamlı azalış gösterdi (\*P<0.001). 48 saatte ise 2 ve 5nM’da kontrole göre anlamlı artış, 10 ve 20nM’a göre anlamlı azalış gözlemlendi (\*P<0.001) (Şekil 4. 40).

#### 4.6.5.2 KMS-28BM hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR9 gen ifade düzeyleri

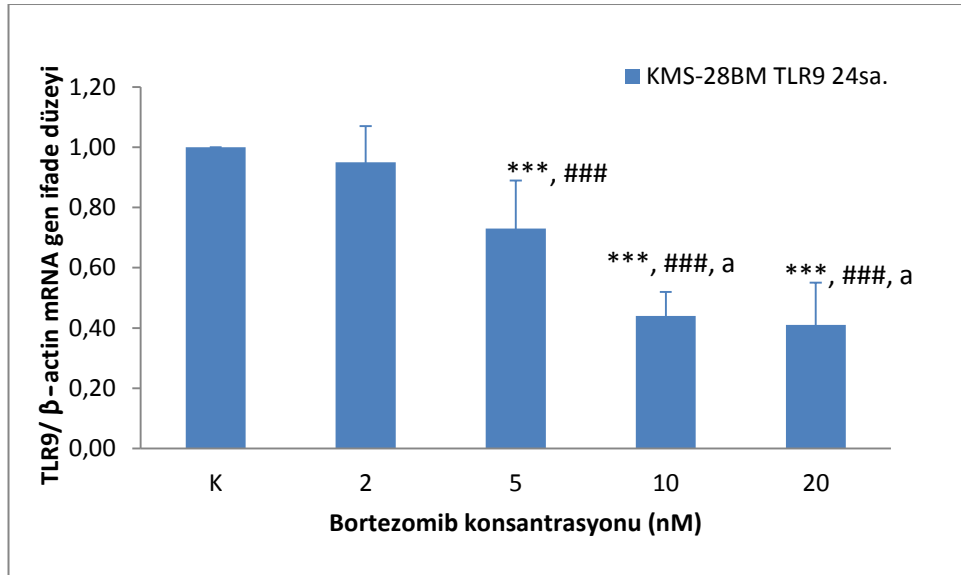
**Çizelge 4.15:** KMS-28BM hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı TLR9 gen ifade düzeylerine etkisi.

| KMS-28BM TLR9 gen ifade düzeyi |                             |                                 |                                 |
|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Bortezomib Konsantrasyonları   | 12 sa. RQ ve standart sapma | 24 saatlik RQ ve standart sapma | 48 saatlik RQ ve standart sapma |
| Kontrol                        | 1,00± 0,00                  | 1,00± 0,00                      | 1,00± 0,00                      |
| 2nM                            | 1,49± 0,15                  | 0,95± 0,12                      | 0,79± 0,04                      |
| 5nM                            | 1,28± 0,12                  | 0,73± 0,16                      | 0,49± 0,07                      |
| 10nM                           | 0,49± 0,15                  | 0,44± 0,08                      | 0,44± 0,11                      |
| 20nM                           | 0,42± 0,10                  | 0,41± 0,14                      | 0,35± 0,08                      |



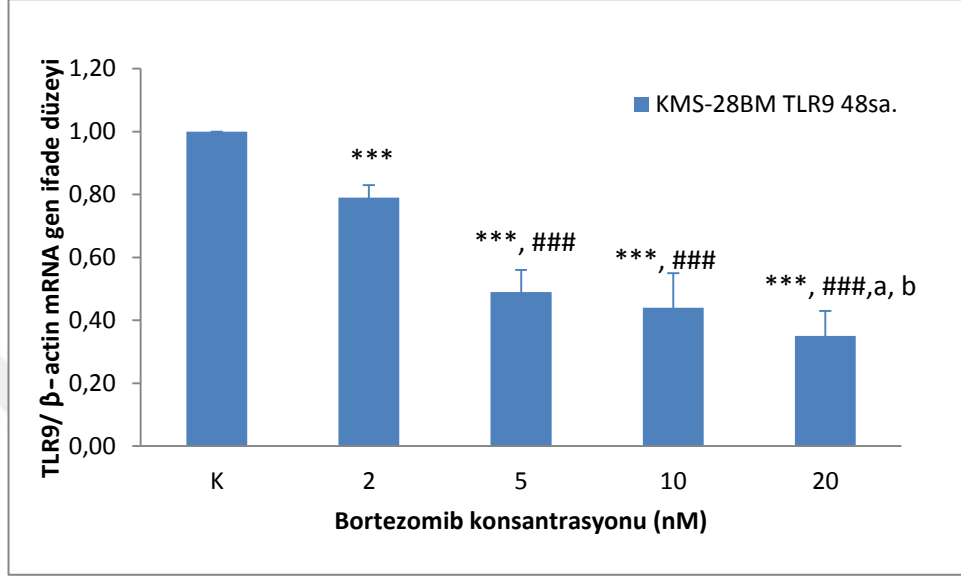
**Şekil 4.41:** KMS-28BM hücre hattında 12 saatlik bortezomib uygulamasının TLR9 gen ifade düzeyine etkisi.

KMS-28BM hücre hattına 12 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR9 gen ifade düzeyi 2 ve 5nM’da kontrole göre anlamlı artış gösterirken 10 ve 20nM’da kontrole göre anlamlı azalış gösterdi (\*\* $P < 0.001$ ). Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında 2nM’a göre 5, 10 ve 20nM’da anlamlı azalış gözlemlendi (### $P < 0.001$ ). 5nM’a göre 10 ve 20nM’da anlamlı azalış gözlemlendi (<sup>a</sup> $P < 0.001$ ) (Şekil 4. 41).



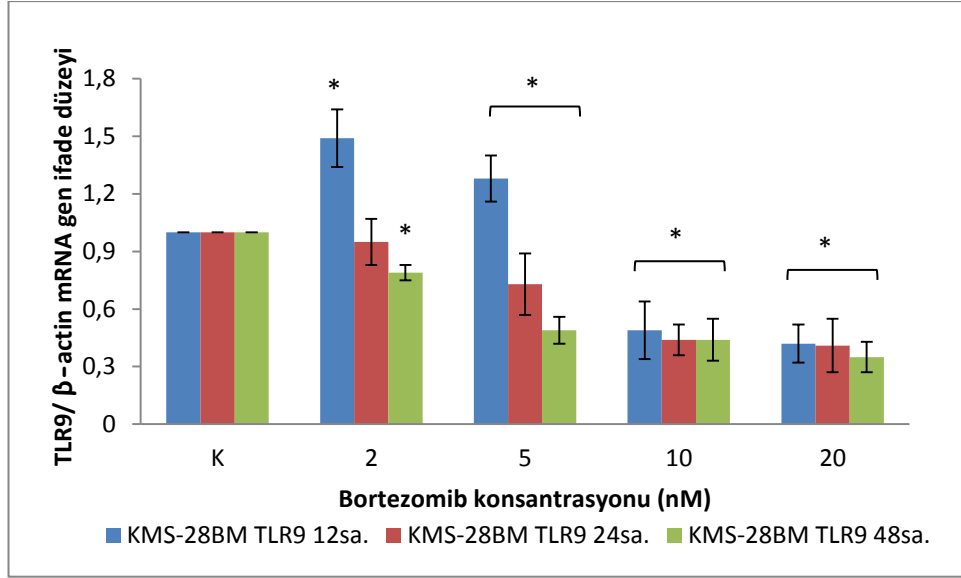
**Şekil 4.42:** KMS-28BM hücre hattında 24 saatlik bortezomib uygulamasının TLR9 gen ifade düzeyine etkisi.

KMS-28BM hücre hattına 24 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR9 gen ifade düzeyi 5, 10 ve 20nM’da kontrole göre anlamlı azalış gösterdi (\*\*P<0.001). Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında 2nM’a göre 5, 10 ve 20nM’da anlamlı azalış gözlemlendi (###P<0.001). 5nM’a göre 10 ve 20nM’da anlamlı azalış gözlemlendi (<sup>a</sup>P<0.001) (Şekil 4. 42).



**Şekil 4.43:** KMS-28BM hücre hattında 48 saatlik bortezomib uygulamasının TLR9 gen ifade düzeyine etkisi.

KMS-28BM hücre hattına 48 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR9 gen ifade düzeyi 2, 5, 10 ve 20nM’da kontrole göre anlamlı azalış gösterdi (\*\*P<0.001). Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında 2nM’a göre 5, 10 ve 20nM’da anlamlı azalış gözlemlendi (###P<0.001). 5nM’a göre 20nM’da anlamlı azalış (<sup>a</sup>P<0.001) gözlemlenirken 10nM’a göre 20nM’da anlamlı azalış gözlemlendi (<sup>b</sup>P<0.01) (Şekil 4. 43).



**Şekil 4.44:** KMS-28BM hücre hattında 12, 24, 48 saatlik bortezomib uygulamasının TLR9 gen ifade düzeyine etkisi.

KMS-28BM hücre hattına 12, 24 ve 48 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra TLR9 gen ifade düzeyi 12 saatte 2 ve 5nM’da anlamlı artış gösterirken 10 ve 20nM’da anlamlı azalış gösterdi (\*P<0.001). 24 saatte 5, 10 ve 20nM’da anlamlı azalış (\*P<0.001), 48 saatte ise tüm konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı azalış gözlemlendi (\*P<0.001) (Şekil 4. 44).

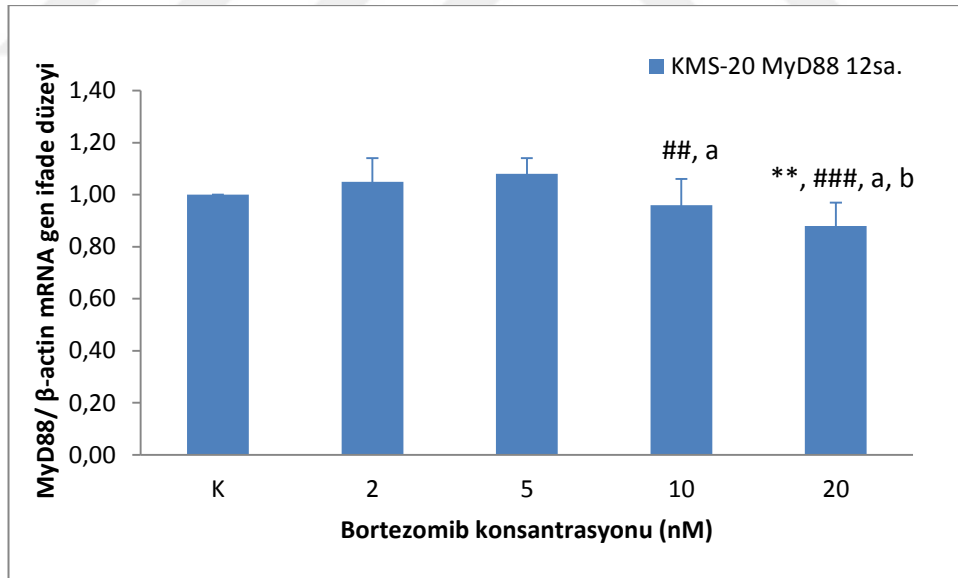
#### 4.6.6 MyD88 gen ifade düzeyleri

KMS-20 ve KMS-28BM hücre hattında farklı bortezomib konsantrasyonlarının 12, 24 ve 48 saatlik uygulanmasından sonra elde edilen MyD88 mRNA gen ifade düzeyleri kantitatif real time RT-PCR (qRT-PCR) yöntemi kullanılarak saptanmıştır. Her genin kontrol grubuna göre gen ifade düzeyindeki katlık değişim (Relative kantitasyon (RQ))  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  değerleri hesaplanmıştır. KMS-20 ve KMS-28BM hücre hattlarındaki MyD88 gen ifadesinin doz ve zamana bağlı RQ ve standart sapma değerleri Çizelge 4.16 ve 4.17’te verilmiştir. KMS-20 hücre hattında 12, 24 ve 48 saatlik gen ifade düzeyleri şekil 4. 45, 4.46, 4.47’de, KMS-28BM hücre hattındaki 12, 24 ve 48 saatlik gen ifade düzeyleri şekil 4. 48, 4. 49, 4. 50’de verilmiştir.

#### 4.6.6.1 KMS-20 hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı MyD88 gen ifade düzeyleri

**Çizelge 4.16:** KMS-20 hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı MyD88 gen ifade düzeylerine etkisi.

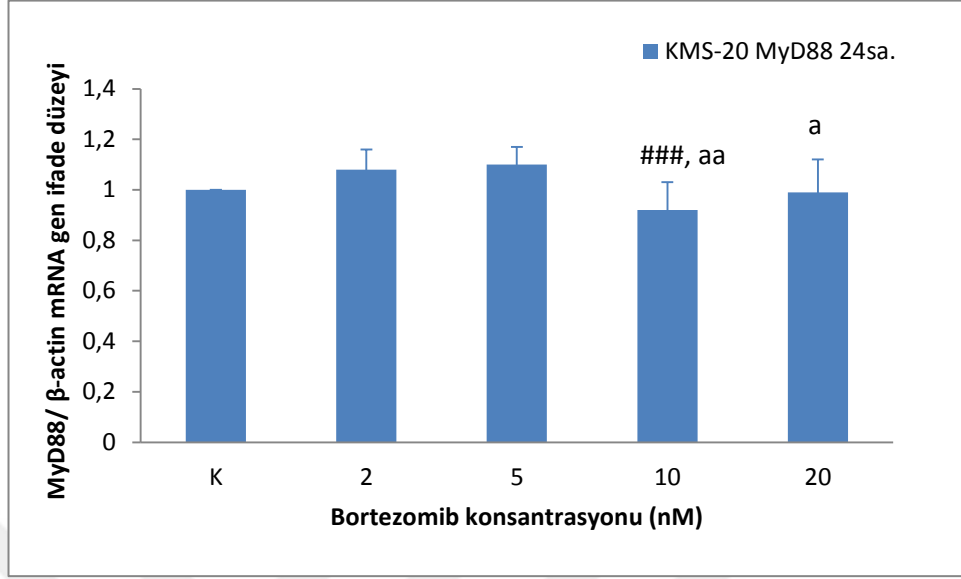
| KMS-20 MyD88 gen ifade düzeyi |                                 |                                 |                                 |
|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Bortezomib Konsantrasyonları  | 12 saatlik RQ ve standart sapma | 24 saatlik RQ ve standart sapma | 48 saatlik RQ ve standart sapma |
| Kontrol                       | 1,00± 0,00                      | 1,00± 0,00                      | 1,00± 0,00                      |
| 2nM                           | 1,05± 0,09                      | 1,08± 0,08                      | 1,25± 0,09                      |
| 5nM                           | 1,08± 0,06                      | 1,10± 0,07                      | 1,33± 0,15                      |
| 10nM                          | 0,96± 0,10                      | 0,92± 0,11                      | 1,40± 0,16                      |
| 20nM                          | 0,88± 0,09                      | 0,99± 0,13                      | 1,47± 0,12                      |



**Şekil 4.45:** KMS-20 hücre hattında 12 saatlik bortezomib uygulamasının MyD88 gen ifade düzeyine etkisi.

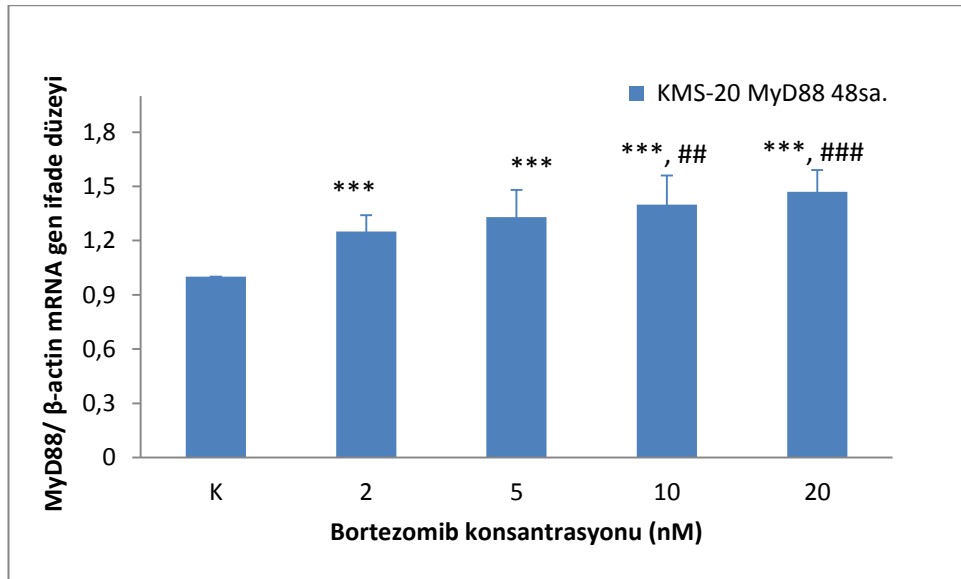
KMS-20 hücre hattına 12 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra MyD88 gen ifade düzeyi sadece 20nM’da kontrole göre anlamlı azalış gösterdi (\*\*P<0.01). Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında 2nM’a göre 10 ve 20nM’da anlamlı azalış (##P<0.01, ###P<0.001), 5nM’a göre 10 ve 20nM’da anlamlı azalış gözlemlendi

(<sup>a</sup>P<0.001). 10nM’da ise 20nM’a göre anlamlı azalış gözlemlendi (<sup>b</sup>P<0.01) (Şekil 4. 45).



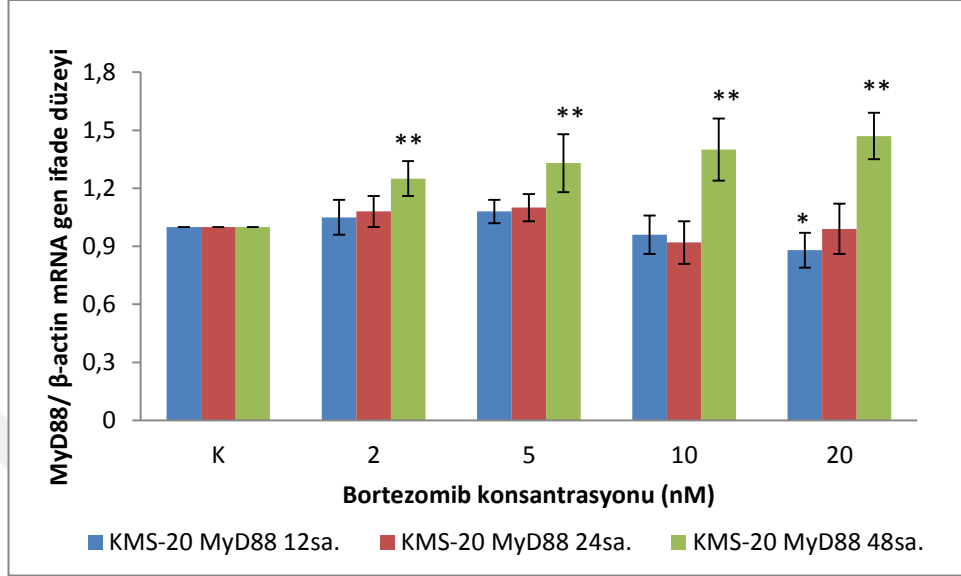
**Şekil 4.46:** KMS-20 hücre hattında 24 saatlik bortezomib uygulamasının MyD88 gen ifade düzeyine etkisi.

KMS-20 hücre hattına 24 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra MyD88 gen ifade düzeyi kontrole göre anlamlılık göstermedi. Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında ise 2nM’a göre 10nM’da anlamlı azalış gözlemlendi (###P<0.001). 5nM’a göre 10 ve 20nM’da anlamlı azalış gözlemlendi (<sup>a</sup>P<0.05, <sup>aa</sup>P<0.001) (Şekil 4. 46).



**Şekil 4.47:** KMS-20 hücre hattında 48 saatlik bortezomib uygulamasının MyD88 gen ifade düzeyine etkisi.

KMS-20 hücre hattına 48 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra MyD88 gen ifade düzeyi 2, 5, 10 ve 20nM’da kontrole göre anlamlı artış gösterdi (\*\*P<0.001). Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında 2nM’a göre 10 ve 20nM’da anlamlı artış gözlemlendi (##P<0.01, ###P<0.001) (Şekil 4. 47).



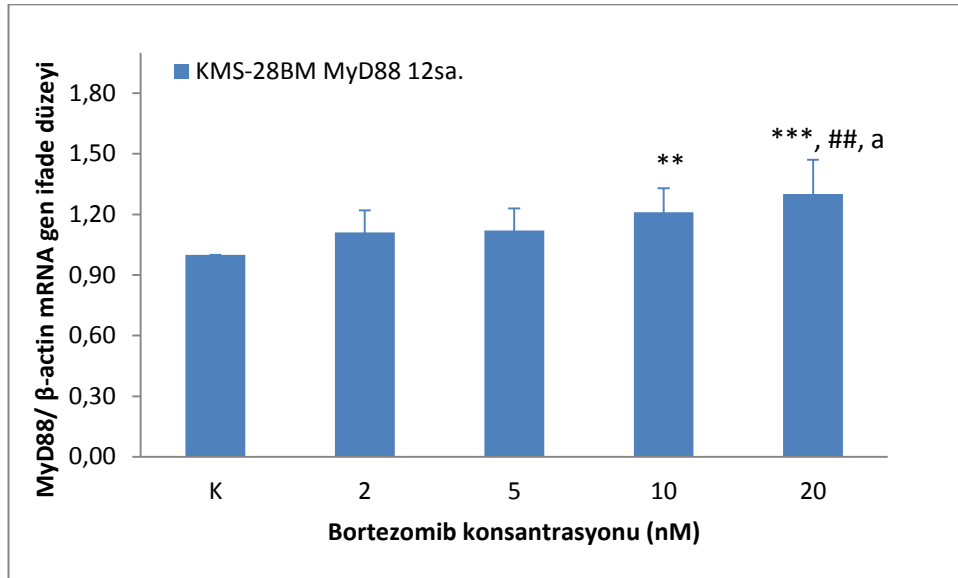
**Şekil 4.48:** KMS-20 hücre hattında 12, 24, 48 saatlik bortezomib uygulamasının MyD88 gen ifade düzeyine etkisi.

KMS-20 hücre hattına 12, 24 ve 48 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra MyD88 gen ifade düzeyi 12saatte sadece 20nM’da kontrole göre anlamlı azalış gösterirken (\*P<0.01), 24 saatte kontrole göre anlamlılık gözlemlenmedi. 48saatte ise tüm konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı artış gözlemlendi (\*\*P<0.001) (Şekil 4. 48).

#### 4.6.6.2KMS-28BM hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı MyD88 gen ifade düzeyleri

**Çizelge 4.17:** KMS-28BM hücre hattında bortezomibin doz ve zamana bağlı MyD88 gen ifade düzeylerine etkisi.

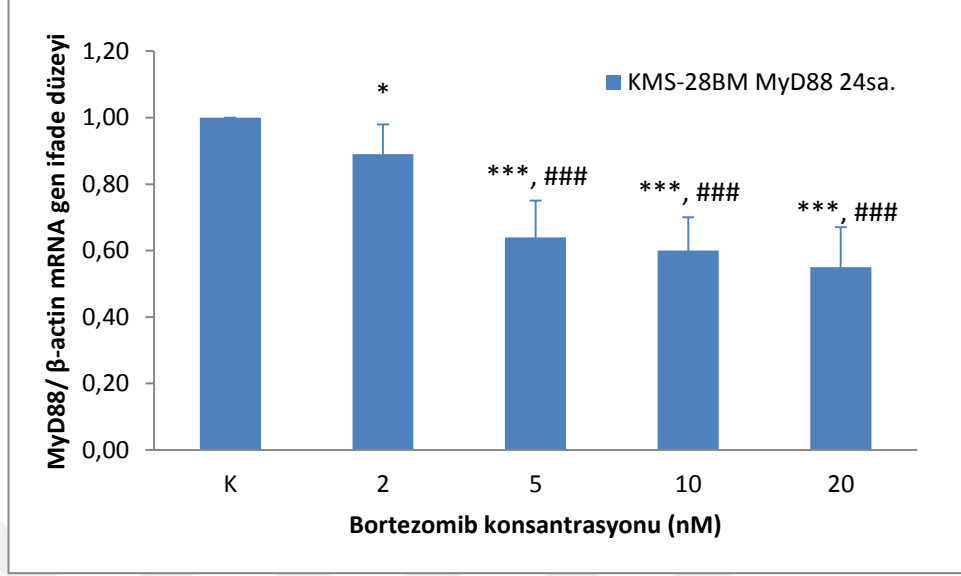
| KMS-28BM MyD88 gen ifade düzeyi |                                 |                                 |                                 |
|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Bortezomib Konsantrasyonları    | 12 saatlik RQ ve standart sapma | 24 saatlik RQ ve standart sapma | 48 saatlik RQ ve standart sapma |
| Kontrol                         | 1,00± 0,00                      | 1,00± 0,00                      | 1,00± 0,00                      |
| 2Nm                             | 1,11± 0,11                      | 0,89± 0,09                      | 0,68± 0,09                      |
| 5nM                             | 1,12± 0,11                      | 0,64± 0,11                      | 0,49± 0,13                      |
| 10nM                            | 1,21± 0,12                      | 0,60± 0,10                      | 0,51± 0,09                      |
| 20nM                            | 1,30± 0,17                      | 0,55± 0,12                      | 0,40± 0,12                      |



**Şekil 4.49:** KMS-28BM hücre hattında 12 saatlik bortezomib uygulamasının MyD88 gen ifade düzeyine etkisi.

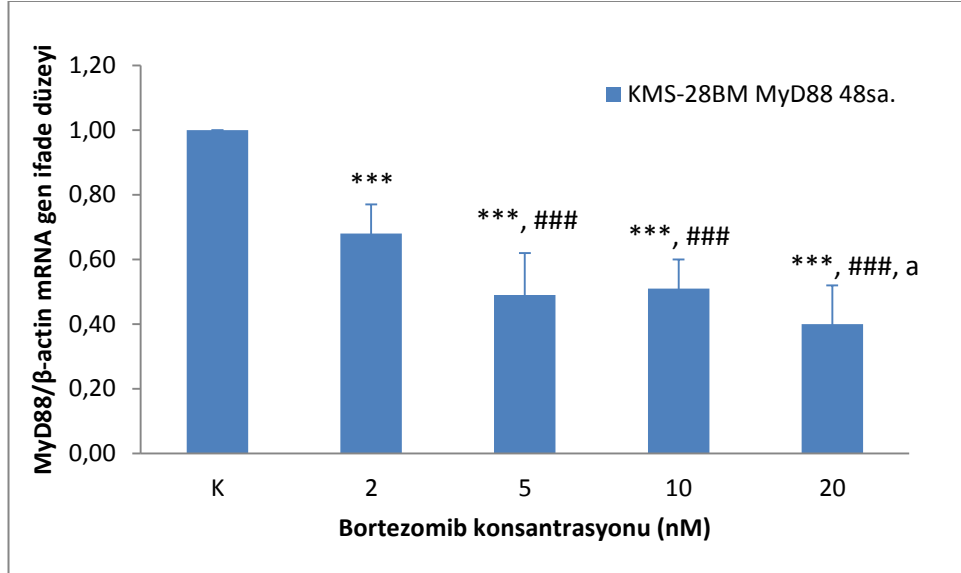
KMS-28BM hücre hattına 12 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra MyD88 gen ifade düzeyi 10 ve 20nM’da kontrole göre anlamlı artış gösterdi (\*\*P<0.01\*\*\*P<0.001). Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında 2nM’a göre sadece

20nM’da anlamlı artış gözlemlenirken ( $^{##}P<0.01$ ), 5nM’a göre 20nM’da anlamlı artış gözlemlendi ( $^aP<0.01$ ) (Şekil 4. 49).



**Şekil 4.50:** KMS-28BM hücre hattında 24 saatlik bortezomib uygulamasının MyD88 gen ifade düzeyine etkisi.

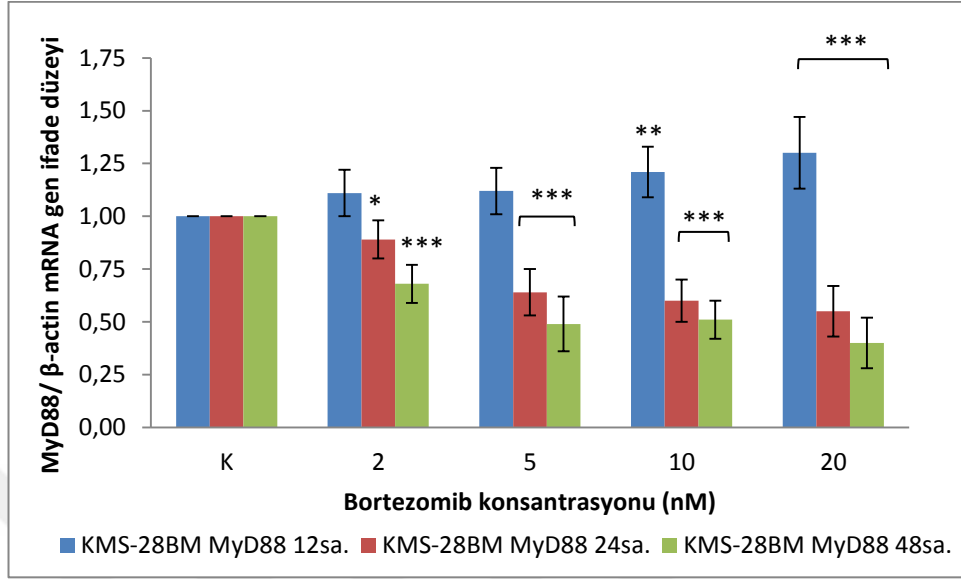
KMS-28BM hücre hattına 24 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra MyD88 gen ifade düzeyi 2, 5, 10 ve 20nM’da kontrole göre anlamlı azalış gösterdi ( $*P<0.05$ ,  $^{***}P<0.001$ ). Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında 2nM’a göre 5, 10 ve 20nM’da anlamlı azalış gözlemlendi ( $^{###}P<0.001$ ) (Şekil 4. 50).



**Şekil 4.51:** KMS-28BM hücre hattında 48 saatlik bortezomib uygulamasının MyD88 gen ifade düzeyine etkisi.

KMS-28BM hücre hattına 48 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra MyD88 gen ifade düzeyi 2, 5, 10 ve 20nM’da kontrole göre anlamlı azalış gösterdi

(\*\*\*P<0.001). Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında 2nM'a göre 5, 10 ve 20nM'da anlamlı azalış gözlemlenirken (###P<0.001), 10nM'a göre 20nM'da anlamlı azalış gözlemlendi (<sup>a</sup>P<0.05) (Şekil 4. 51).



**Şekil 4.52:** KMS-28BM hücre hattında 12, 24, 48 saatlik bortezomib uygulamasının MyD88 gen ifade düzeyine etkisi.

KMS-28BM hücre hattına 12, 24 ve 48 saat süre ile bortezomib uygulandıktan sonra MyD88 gen ifade düzeyi 12 saatte 10 ve 20nM'da kontrole göre anlamlı artış gösterdi (\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001). 24 ve 48 saatte ise tüm konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı azalış gözlemlendi (\*P<0.05, \*\*\*P<0.001) (Şekil 4. 52).

TLR'ler, katalitik olmayan, moleküler düzeyde enfeksiyon, doku hasarı ve inflamasyonla bağlantılı tek transmembran reseptörlerdir [126, 127]. Doğumsal ve adaptif bağışıklıktaki yanıtlar için kritik olan TLR'ler bağışıklık hücreleri ile sınırlı değildir. Solid tümörler de dahil olmak üzere, akut ve kronik lenfositik lösemi (ALL ve CLL) gibi lösemiler, lenfoma ve MM gibi tümör hücrelerinde de ifade edilmektedir [11,128]. İnsan myelom hücre hattı (HMCL) ve MM primer hücrelerinde uyarılan TLR'in proliferasyon artışına, hayatta kalmaya, apoptoz indüksiyonuna veya baskılanmasına, ilaç direncine ve bağışıklık sisteminden kaçış gibi etkilere sahip olduğu ileri sürülmüştür [9]. TLR'ler MM hücrelerinde ifade edilirken, kemik iliği mikroçevresinin tümör kaynaklı sinyallerini inflamasyonla yanıtladığı gösterilmiştir [10,129].

Bugün birçok hematolojik kanserlerde kullanılan proteazom inhibitörü bortezomibin hem kemik iliği çevresinde MM hücreleri üzerine, hem de hücreler arası etkileşimler ve

sitokin salınımı üzerine etki ederek tümör hücresinin büyümesini bloke ederek, apoptoza neden olduğu ve ilaç direncinin üstesinden gelebileceği bildirilmiştir [16]. Yapılan son araştırmalara göre MM hastalarının yaklaşık üçte biri bortezomibe dirençli hale gelmektedir [37]. Dirençlilik gelişen MM'da TLR olan ilişkisi halen tam aydınlatılmamıştır. Bununla birlikte, şu ana kadar TLR'ler ve kanser arasındaki bağlantıyı sağlayan çoğu çalışma mRNA çalışmaları ile sınırlandırılmıştır. mRNA seviyesindeki farklılıklar, çeşitli hücrelerde ifade edilen TLR'lerin farklılıklarından ve hücrel yanıtlarından kaynaklanmaktadır [2].

Öte yandan, farklı B hücresi grupları arasındaki TLR ekspresyon örüntüsü ve aktivasyonu değişmektedir. Örneğin dolaşımdaki naif B hücreleri, bellek B hücrelerine göre zayıf ifade edilirken bazı TLR aktivasyonuna da yanıt verirler. B hücresi reseptör etkileşimi ile gerçekleşen aktivasyon, aktif ve bellek B hücrelerinde TLR9 ve TLR10'un ifade düzeyini artırır [9].

MM plazma hücreleri, TLR1'den TLR9 kadar geniş bir yelpazede ifade edilmektedir. TLR'ler hücre hatlarında, kemik iliğinde ya da diğer dokulardaki primer hücrelerde heterojen bir dağılıma sahiptir [9]. MM hücreleri, normal B hücreleriyle karşılaştırıldığında, TLR10 B hücrelerinde anlamlı şekilde ifade edilmektedir. Buna karşın TLR3, 4, 8 neredeyse B hücreleri tarafından ifade edilememektedir [130, 131]. Plazma hücrelerindeki TLR ifadesi dokuya özgü olabileceği bildirilmiştir. Normal plazma hücrelerindeki zayıf sentezlenme ve kemik iliğinde MM hücrelerindeki TLR'lerin yüksek ifadesi hastalığın patogenezinde veya progresyonunda rol oynayabilir. Malign plazma hücrelerinin, büyümesi ve hayatta kalması kemik iliği stromal hücrelerine (BMSC'ler) ve hücre dışı matrisle (ECM) bağlantılıdır. MM hücrelerinin BMSC'ye yapışması IL-6, VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü), bFGF (bazik fibroblastik büyüme faktörü) salgısı ve NFκB aktivasyonu ilişkilendirilmiştir. NFκB yolağındaki bileşenlerin mutasyonu, MM hücrelerinde TLR'in modülasyonuna katkıda bulunabilir, çünkü bu tür mutasyonların hem klasik hem de alternatif yollardaki NFκB sinyalizasyonunun yapıcı aktivasyonu ile sonuçlandığı bildirilmiştir [9]. Bununla birlikte, viral enfeksiyonlar ve endojen ligandlar gibi diğer faktörlerde MM hücrelerinde TLR modülasyonuna neden olabilir. Dahası, HMCL izolasyon kaynağı, hücreler üzerinde TLR ekspresyon modellerini etkilediği görülmüştür. Örneğin, plevral efüzyondan izole edilen hücreler üzerinde TLR4 ve TLR7 ekspresyonu, tek bir hastanın kemik iliğinden izole edilen

hücrelerde daha yüksek bulunurken, TLR9 sadece kemik iliğinde saptanabilmiştir [131]. Aynı zamanda bu tutarsızlığı hastalığın evresi ve hücresel mikroçevresindeki farklılıklar ile ilişkilendirilmiştir [9].

MM hücrelerinde ve tümör mikroçevresindeki hücrelerde TLR ifade şekilleri çok sayıda özelliğe sahiptir. MM hücre hatlarına TLR1, TLR7, TLR8 ve TLR9 yüksek düzeyde ifade olurken TLR4 orta düzeyde ifade olmaktadır. Yalnızca TLR2 ve TLR5 için mRNA seviyeleri düşerken, TLR3'ün mRNA seviyeleri TLR3 protein seviyelerine göre daha düşüktür [10]. Dahası MM primer hücrelerinde TLR1, 7 ve 9'un en belirgin olarak ifade edildiği ve TLR2, 8 en az ifade edilen TLR'lerin olduğu bildirilmiştir [93].

TLR'lerin bireysel rollarına baktığımızda; TLR1 ve TLR6, yalnızca TLR2 ile heterodimerler oluşturduktan sonra etkindir. Bu heterodimerler, triasillenmiş veya diasillenmiş bakteriyel lipopeptitlere cevap verir [2]. MM hücrelerinde TLR1 ve TLR2'nin aşırı ifadesi, kemik iliği stromal hücrelerine olan yapışmalarını ve bortezomibe olan duyarlılığını artırır ve MM hücreleri üzerindeki kemik iliği stromal hücrelerinin koruyucu etkisini nötralize ettiği bilinmektedir [132]. Bizim çalışmamızda gen ifade düzeylerine bakıldığında KMS-20 ve KMS-28BM hücre hatlarında zamana ve doza bağlı olarak TLR2 gen ifadesinde artış gözlemlendi. Fakat TLR2 ifade düzeyinin dirençli hücrede hassas hücreye göre doz ve zamana bağlı olarak çok anlamlı azalış gösterdiği bulunmuştur. Bu sonuç bortezomibe duyarlılığın arttığını doğrulamaktadır.

TLR3' ler virüslerden türetilmiş çift sarmallı RNA ile aktive edilirler [2]. TLR3 'ün apoptozu indükleyebilir ve MM hücrelerinde karşı bağışıklık yanıtlarını arttırabilir [93]. Çalışmamızda bortezomibe dirençli KMS-20 hücre hattında TLR3 gen ifadesi tamamen baskılandığı için saptanamadı. Hassas grup KMS-28BM hücre hattında ise 12, 24 ve 48 saatlik dozlarda anlamlı azalış gösterirken 48 saatte 10 ve 20nM konsantrasyonlarında TLR3 gen ifadesi saptanamadı bu sonuçlar dirençli hücre hattı ile bortezomibin yüksek konsantrasyonlarında apoptozu indüklediği düşünülmektedir.

TLR4, gram-negatif bakterilerin plazma membranından lipopolisakkaritler tarafından tetiklenir. In vitro çalışmalar için hızlı bir patojen sensördür ve CD4+ T hücrelerinin hızlı proliferasyonunu ve hayatta kalmasını uyarır [133]. TLR4'ün aşırı ekspresyonu,

hücre çoğalması, hayatta kalma ve bağışıklık gözetiminden kaçma gibi çeşitli tümör öncesi etkilere sahiptir [130]. Çalışmamızda dirençli hücre hattı KMS-20'de TLR4 mRNA gen ifadesi tamamen baskılanmıştır fakat hassas hücre hattı KMS-28BM hücre hattında doza ve zamana bağlı azalış gösterdiği saptanmıştır.

TLR7 gen ifadesinde ise bortezomibe dirençli KMS-20 hücre hattında zaman ve doza bağlı artışın olduğu saptandı. Hassas KMS-28BM hücre hattında ise 12 saatlik çalışmada doza bağlı artış gözlemlenirken 24 ve 48 saatlik çalışmalarda anlamlı azalışın olduğu saptandı.

TLR9 ligandı CpG ODN, IL-6, IL-10, Ig'lerin salgılanmasını tetikleyerek proliferasyonu, hayatta kalmayı ve farklılaşmayı artırır ve B hücrelerinde çeşitli aktivasyon ve kostimülatör proteinlerin ekspresyonunu arttırdığı bilinmektedir [34]. Bizim çalışmamızda TLR9 gen ifadesine bakıldığında hem KMS-20 hem de KMS-28BM hücre hatlarında doz ve zamana bağlı anlamlı azalışın olduğu saptandı. KMS-20 hücre hattında yüksek konsantrasyonlarda anlamlı azalışın olduğu görülmektedir. İnsan B lenfositlerinde TLR7, TLR9 ve TLR10'u kuvvetle eksprese edilir ve TLR3, TLR4 ve TLR8'i ifade edilmez [134]. Ayrıca MyD88 ve TLR'in ekspresyon seviyesi MGUS'dan MM'ya geçişte arttığı rapor edilmiştir [9]. TLR2, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8 ve TLR9 sinyalleme kaskadını aktive edebilmek için MyD88 bağımlıdır. Çalışmamızda MyD88'in dirençli hücre hattında 48 saatlik çalışmada anlamlı bir artışın olduğu saptanmıştır. 12 ve 24 saatlik çalışmalarda ise gen ifadesinde yüksek konsantrasyonlarda azalma olduğu gözlemlendi. Hassas hücre hattında ise 12 saatin yüksek konsantrasyonlarında gen ifadesi artarken, 24 ve 48 saatte anlamlı bir azalışın olduğu saptanmıştır.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında FDA tarafından onaylanmış ve klinikte halen kullanılmaya devam edilen proteazom inhibitörü bortezomib kullanıldı. Bortezomibe dirençli ve hassas MM hücre hatlarındaki TLR'lerin ifade düzeylerindeki farklılıklar saptanarak aşağıdaki sonuçlar elde edildi:

1. KMS20 (bortezomibe dirençli) ve KMS-28BM (hassas) MM hücreleri farklı konsantrasyonlarda bortezomib (1nM, 2nM, 5nM 10nM, 20nM) ile 12, 24, 48 saat muamele edildi. MM hücre hatlarından bortezomibe dirençli KMS-20 ve bortezomibe hassas KMS-28BM iki hücre hattında bortezomibin % canlılığa etkisi MTT testi yapılarak belirlendi. KMS-20 hücre hattında bortezomibin 12, 24 ve 48 saat için IC<sub>50</sub> dozları 31,62nM; 15,85nM; 5,89nM olarak hassas KMS-28BM hücre hattında ise 12, 24 ve 48 saat için IC<sub>50</sub> dozları 11,84nM; 5,30nM; 3,66nM olarak saptandı.

2. KMS-20 ve KMS-28BM hücre hatlarının dirençlik indeksleri hesaplanarak hücrelerin bortezomibe hassaslığı ve dirençliliği test edildi. (12sa RI:2,67nM, 24sa RI:2,99nM, 48sa RI:1,61nM). KMS-20 hücre hattının KMS-28BM hücre hattına göre dirençli olduğu doğrulandı.

3. İkinci basamakta örneklerden RNA izolasyonu yapılarak ardından cDNA sentezi gerçekleştirildi. Kantitatif RT-PCR yöntemi (qRT-PCR) kullanılarak TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR9, MyD88 genlerinin mRNA düzeyindeki değişimler 2<sup>-ΔΔCt</sup> yöntemi ile saptandı.

4. Hücre membranında yer alan TLR2 ve TLR4'ün dirençli hücrelerde ve hassas hücrelerdeki gen ifadesi sonucunda TLR2 her iki hücre hattında doz ve zaman bağlı olarak arttı fakat dirençli hücrede gen ifadesinde hassas hücreye göre anlamlı azalışın olduğu gözlemlenmiştir. TLR4 ise hassas hücrede doz ve zaman bağlı azalış saptanırken, dirençli hücre gen ifadeleri tamamen baskılanmıştır. Literatürde TLR4'ün MM'da orta düzeyde ifade edildiği rapor edilmiştir [10]. Bu sonuçlar TLR4'ün dirençlilikte rol alabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca TLR4'ün güçlü bir adaptif immün yanıt oluşturmada rol aldığı bilinmektedir. TLR4 agonistleri ile

sağlanan TLR4 aktivasyonu, kanser terapide kullanılabileceği rapor edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda TLR4'ün dirençlilik mekanizmasında rol alması yeni tedavilerin geliştirilmesine yardımcı olabilir.

5. Hücrede endozomlarda yer alan TLR3, TLR7 ve TLR9'un gen ifadesi incelendiğinde TLR3'ün hassas hücrede doz ve zamana bağlı olarak azalış gösterdiği dirençli hücrede ise tamamen baskılandığı saptanmıştır. Literatürde TLR3'ün L363 ve U266 hücre hatlarında da ifade olmadığı ile ilgili çalışmalar mevcuttur [135]. Ayrıca TLR3'ün apoptoziste rol aldığı rapor edilmiştir [93]. Bizim sonuçlarımızda TLR3'ün apoptozisle olan ilişkisini doğrulamaktadır.

6. TLR7'nin yüksek düzeyde ifade olduğu literatür de bildirilmiştir [10]. Endozomlarda yer alan bu reseptör, MyD88 bağımlı sinyal yolağını kullanmaktadır. Çalışmamızda TLR7 gen ifadesi sonucunda hassas hücrede 12 saatlik uygulamada doza bağlı artış gözlemlenirken 24 ve 48 ssatte doza bağlı azalma gösterdiği saptandı. İki hücre hattı karşılaştırıldığında doz ve zamana bağlı olarak düşük ifade gözlemlendi.

7. MyD88 bağımlı sinyal yolağını kullanan bir diğer reseptör TLR9'dur. Literatürde TLR9'un yüksek düzeyde ifade olduğu bildirilmiştir [10]. Bizim sonuçlarımızda TLR9'un hem hassas hem de dirençli hücrede anlamlı ifade olduğu saptandı. Doz ve zamana bağlı olarak iki hücre hattında da anlamlı azalış gösterdi. Ancak dirençli hücrede hassas hücreye göre daha yüksek düzeyde gen ifadesi gözlemlendi.

8. MyD88 TLR'in dışında birçok sinyal yolağının kaskadının aktifleştirmesi için gereklidir. MyD88 sinyalleme kaskadı TLR2, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8 ve TLR9 için gereklidir. Bizim çalışmamızda MyD88'in dirençli hücrede sadece 48 saatte anlamlı artışının olduğu saptanırken, hassasta özellikle 24 ve 48 ssatte doza ve zamana bağlı azalmanın olduğu saptanmıştır. MyD88'in dirençlilikte rol olabileceği düşünülmektedir.

9. Bu tez çalışması ile bortezomibe dirençli ve hassas MM hücre hatlarında TLR'lerin ifade düzeylerindeki farklılıklar saptanarak TLR temelli tedavinin geliştirilmesi için ön çalışmalar yapılmıştır.

10. Bu sonuçlar doğrultusunda gelecekte, TLR susturularak (uygun siRNA ya da antagonistle) ya da aktive edilerek (uygun ligandlarla) myeloma hücrelerinde apoptozisi uyarıp yeni tedavilerin saptanabileceği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Mahindra, A., Hideshima, T. ve Anderson, K.C., 2010. Multiple myeloma: biology of the disease, *Blood Reviews*, 24, 5–11.
2. Thakur, K. K., Bolshette, N. B., Trandafir, C., Jamdade, V. S., Istrate, A., Gogoi, R. ve Cucuianu, A., 2015. Role of toll-like receptors in multiple myeloma and recent advances. *Experimental Hematology*, 43, 3, 158-167.
3. Pandey, M. K., Amin, S. G., Zangari, M. ve Talamo, G., 2015. Drug Resistance in Multiple myeloma: How to Cross the Border, *Annals Hematolog Oncology*, 2, 2, 1025.
4. Bhatelia, K., Singh, K. ve Singh, R., 2014. TLRs: Linking inflammation and breast cancer, *Cellular Signalling*, 26, 2350-2357.
5. Zhang, X., Xu, J., Ke, X., Zhang, S., Huang, P., Xu, T., Huang, L., Lou, J., Shi, X., Sun, R., Wang, F. ve Pan, S., 2014. Expression and function of Toll-like receptors in peripheral blood mononuclear cells from patients with ovarian cancer, *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 64, 3, 275-286.
6. Abdi, J., Garssen, J. ve Redegeld, F., 2014. Toll-like receptors in human multiple myeloma :new insight into inflammation-related pathogenesis, *Curr Mol Med*, May;14, 4, 423-31.
7. De Nardo, D., 2015. Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation, *Cytokine* 74, 181–189.
8. Verstrepen, L. ve Beyaert, R., 2014. Receptor proximal kinases in nfkb signaling as potential therapeutic targets in cancer and inflammation, *Biochemical Pharmacology* 92, 519-529.
9. Abdi, J., Engels, F., Garssen, J. ve Redegeld, F., 2011. The role of toll-like receptor mediated signalling in the pathogenesis of multiple myeloma, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 80, 2, 225-240.
10. Abdi, J., Mutis, T., Garssen, J. ve Redegeld, F., 2013. Characterization of the Toll-like Receptor Expression Profile in Human Multiple myeloma Cells. *PLoS ONE* 8, 4,e60671.
11. Isaza-Corre, J., M. Liang, Z., Anke, Van Den Berg., Diepstra, A. ve Visser, L., 2014. Toll-Like Receptors In The Pathogenesis Of Human B Cell Malignancies, *Journal Of Hematology & Oncology* 7,57.
12. Zheng, M. M., Zhang, Z., Bemis, K., Belch, A. R., Pilarski, L. M. ve Shively, J. E., 2013. The Systemic Cytokine Environment Is Permanently Altered in Multiple myeloma, *PLoS ONE* 8, 3, e58504.
13. Gorgun, G. T., Whitehill, G., Anderson, J. L., Hideshima, T., Maguire, C., Laubach, J., Raje, N., Munshi, N. C., Richardson, P. G. ve Anderson, K. C., 2014. Tumor-promoting immune-suppressive myeloid-derived suppressor cells in the multiple myeloma microenvironment in humans, *Blood* 121, 15, 2975-2987.
14. Harsini, S., Beigy, M., Akhavan-Sabbagh, M. ve Rezaei, N., 2014. Toll-like receptors in lymphoid malignancies: Double-edged sword, *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 89, 262–283.

15. Adams, J., 2004. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs, *Cancer Cell*, 5, 5, 417-421.
16. Teicher, B. A. ve Tomaszewski, J. E., 2015. Proteasome inhibitors, *Biochemical Pharmacology*, 96, 1, 1-9.
17. Röllig, C., Knop, S. ve Bornhäuser, M., 2015. Multiple myeloma, *Lancet*, 385, 2197-2208.
18. Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N. ve Sarkar, S., 2014. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers*, 6, 3, 1769-1792.
19. Lipchick, B. C., Fink, E. E. ve Nikiforov, M. A., 2016. Oxidative stress and proteasome inhibitors in multiple myeloma, *Pharmacological Research*, 105, 210-215.
20. Haznedar, R., 2013. Plazma hücreleri ve immünoglobulinler, *Türk Hematoloji derneği Hematolog*, 3-1.
21. Hillman, R. S., Ault, K. A., Leporrier, M. ve Rinder, H. M., 2012. Klinik uygulamalarda Hematoloji, 5. Baskı, Güneş Tıp Kitapevleri, Ankara, Türkiye.
22. Abbas, K. A., Lichtman, A. H. ve Pillai, S., 2015. Temel immünoloji immün sistemin işlevleri ve bozuklukları, editör, Camcıoğlu, Y. ve Deniz, G., 4.baskı, Güneş Tıp Kitapevleri, Ankara, Türkiye.
23. Loureiro, L. R., Carrascal, M. A., Barbas, A., Ramalho, J. S., Novo, C., Delannoy, P. ve Videira, P. A., 2015. Challenges in antibody development against Tn and Sialyl-Tn antigens. *Biomolecules*, 5, 3, 1783-1809.
24. URL-1 < <https://www.aacc.org/global-health-outreach/lab-tests-online> >, alındığı tarih: 29.06.2017
25. Xu, Y., Zhao, Y., Huang, H., Chen, G., Wu, X., Wang, Y., Chang, W., Zhu, Z., Feng, Y. ve Wu, D., 2010. 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-Kb, *British Journal Of Haematology*, 150, 5, 543-553.
26. Jaffe, E. S., Arber, D. A., Campo, E., Harris, N. Lee. ve Quintanilla-Martinez, Leticia. 2017. *Hematopathology, Second Edition*, Elsevier, Inc., Philadelphia, USA.
27. Niederhuber, J. E., Armitage, J. O., Doroshow, J. H., Kastan, M. B. ve Tepper, J. E., 2014. *Abeloff's Clinical Oncology, Fifth Edition*, Churchill Livingstone, an imprint of Elsevier Inc., Philadelphia, USA.
28. Kellerman, R. D. ve Bope, E. T., 2017. *Conn's Current Therapy E-Book*, Elsevier Inc., Philadelphia, USA.
29. Aydın, Y., 2005. Multiple myelom, İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Sempozyum dizisi, 45, 249- 262.
30. Fulciniti, M., Munshi, N. C. ve Martinez-Lopez, J., 2015. Deep response in multiple myeloma: A critical review, *BioMed research international*, 2015.
31. Kyle, R. A. ve Rajkumar, S. V., 2007. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smouldering multiple myeloma: emphasis on risk factors for progression, *British journal of haematology*, 139, 5, 730-743.
32. Ayhan, B., 2013. Multiple myeloma (plazma hücre kanseri)'nın spektrofotometrik ve spektroskopik yöntemler ile araştırılması, Doktora Tezi, Ankara üni. Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
33. Kocoglu, M. ve Badros, A., 2016. The role of immunotherapy in multiple myeloma, *Pharmaceuticals*, 9, 1, 3.

34. Kyle, R. A., ve Rajkumar, S. V., 2009. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma, *Leukemia*, 23, 1, 3-9.
35. Hideshima, T., Richardson, P., Chauhan, D., Palombella, V. J., Elliott, P. J., Adams, J. ve Anderson, K. C. 2001. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Research*, 61, 7, 3071-3076.
36. Chen, D., Frezza, M., Schmitt, S., Kanwar, J. ve P Dou, Q., 2011. Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Current cancer drug targets*, 11, 3, 239-253.
37. Gu, J. L., Li, J., Zhou, Z. H., Liu, J. R., Huang, B. H., Zheng, D. Ve Su, C., 2012. Differentiation induction enhances bortezomib efficacy and overcomes drug resistance in multiple myeloma, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 420, 3, 644-650.
38. Mujtaba, T. ve Dou, Q. P., 2011. Advances in the understanding of mechanisms and therapeutic use of bortezomib, *Discovery medicine*, 12, 67, 471.
39. Lü, S. ve Wang, J., 2013. The resistance mechanisms of proteasome inhibitor bortezomib, *Biomarker Research*, 1, 1, 13.
40. Verbrugge, S. E., Scheper, R. J., Lems, W. F., de Gruijl, T. D. ve Jansen, G., 2015. Proteasome inhibitors as experimental therapeutics of autoimmune diseases, *Arthritis Research & Therapy*, 17, 1, 17.
41. Oerlemans, R., Franke, N. E., Assaraf, Y. G., Cloos, J., van Zantwijk, I., Berkers, C. R., Scheffer, G. L., Debipersad, K., Vojtekova, K., Lemos, C., van der Heijden, J. W., Ylstra, B., Peters, G. J., Kaspers, G. L., Dijkmans, B. A. C., Scheper, R. J. ve Jansen, G., 2008. Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit  $\beta 5$  (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein, *Blood*, 112, 6, 2489-2499.
42. Groll, M., Huber, R. ve Moroder, L., 2009. The persisting challenge of selective and specific proteasome inhibition, *Journal Of Peptide Science*, 15, 2, 58-66.
43. Horie, R., 2013. Molecularly-targeted Strategy and NF- $\kappa$ B in lymphoid malignancies. *Journal Of Clinical and Experimental Hematopathology*, 53, 3, 185-195.
44. Fan, Y., Mao, R. ve Yang, J., 2013. NF- $\kappa$ B and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. *Protein & Cell*, 4, 3, 176.
45. Van Waes, C., 2007. Nuclear factor-kappaB in development, prevention, and therapy of cancer, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13, 4, 1076-1082.
46. Tabruyn, S.P. ve A.W. Griffioen, 2008. NF-kappa B: a new player in angiostatic therapy. *Angiogenesis*, 11, 1, 101-106.
47. Karin, M., 2006, Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression, *Nature*, 441, 7092, 431-436.
48. Fuchs, O., 2010, Transcription factor NF-kappaB inhibitors as single therapeutic agents or in combination with classical chemotherapeutic agents for the treatment of hematologic malignancies, *Current Molecular Pharmacology*, 3, 3, 98-122.
49. Hoesel, B. ve Schmid, J. A., 2013. The complexity of NF $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer, *Molecular Cancer*, 12, 1, 86.
50. Richardson, P. G., Barlogie, B., Berenson, J., Singhal, S., Jagannath, S., Irwin, D., Rajkumar, V., Srkalovic, G., Alsina, M., Alexanian, R., Siegel, D.,

- Orlowski, R. Z., Kuter, D., Limentani, S. A., Lee, S., Hideshima, T., Esseltine, D. L., Kauffman, M., Adams, J., Schenkein, D. P. ve Anderson, K., 2003. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *New England Journal Of Medicine*, 348, 26, 2609-2617.
51. Aksoy, Y., 2010. Kanserde İlaç Direncinin Üstesinden Gelmenin Yolları: Yeni İlaçların Tasarımı, *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 3,6, 2011-2016.
52. Mitra, A. K., Stessman, H., Shaughnessy, J., & Van Ness, B., 2014. Profiling Bortezomib Resistance in Multiple myeloma: Implications in Personalized Pharmacotherapy, In *Resistance to Proteasome Inhibitors in Cancer*, 117-147, Springer International Publishing.
53. Markovina, S., Callander, N. S., O'Connor, S. L., Kim, J., Werndli, J. E., Raschko, M., Leith, C. P., Kahl, B. S., Kim, K. M. ve Miyamoto, S., 2008. Bortezomib-resistant nuclear factor- $\kappa$ B activity in multiple myeloma cells, *Molecular Cancer Research*, 6, 8, 1356-1364.
54. Bohnhorst, J., Rasmussen, T., Moen, S. H., Fløttum, M., Knudsen, L., Børset, M., Espevik, T. ve Sundan, A., 2006. Toll-like receptors mediate proliferation and survival of multiple myeloma cells, *Leukemia*, 20, 6, 1138-1144.
55. Hosseini, A. M., Majidi, J., Baradaran, B. ve Yousefi, M., 2015. Toll-like receptors in the pathogenesis of autoimmune diseases, *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5, 1, 605.
56. Inci, A. ve Bişkin, Z., 2007. Toll-Like reseptörler ve protozoon enfeksiyonlarındaki rolleri, *Erciyes Üniv Vet Fak Dergisi*, 4, 2, 121-8.
57. Anderson, K. V., Bokla, L. ve Nüsslein-Volhard, C., 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product, *Cell*, 42, 3, 791-798.
58. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. ve Hoffmann, J. A., 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults, *Cell*, 86, 6, 973-983.
59. Michel, T., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A. ve Royet, J., 2001. *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein, *Nature*, 414, 6865, 756-759.
60. Yeh, D. W., Huang, L. R., Chen, Y. W., Huang, C. Y. F. ve Chuang, T. H., 2016. Interplay between Inflammation and Stemness in Cancer Cells: The Role of Toll-Like Receptor Signaling, *Journal of İmmünology Research*, 2016.
61. McGuire, V. A. ve Arthur, J. S. C., 2015. Subverting toll-like receptor signaling by bacterial pathogens, *Frontiers in immünology*, 6.
62. Kawai, T. ve Akira, S., 2007. Signaling to NF $\kappa$ B by Toll-like receptors, *Trends in molecular medicine*, 13, 11, 460-469.
63. Lee, M. S. ve Kim, Y. J., 2007. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk, *Annu. Rev. Biochem.*, 76, 447-480.
64. Bianchi, M. E., 2007. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger, *Journal of leukocyte biology*, 81, 1, 1-5.
65. Rakoff-Nahoum, S. ve Medzhitov, R., 2009. Toll-like receptors and cancer, *Nature Reviews Cancer*, 9, 1, 57-63.
66. Abdi, J., Mutis, T., Garssen, J. ve Redegeld, F. A., 2014. 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*, 9, 5, e96608.
67. Kang, J. Y. ve Lee, J. O., 2011. Structural biology of the Toll-like receptor family, *Annual Review Of Biochemistry*, 80, 917-941.
  68. Tsan, M. F., 2006. Toll-like receptors, inflammation and cancer, In *Seminars in Cancer Biology*, 16, 1, 32-37.
  69. Kaisho, T. ve Akira, S., 2006. Toll-like receptor function and signaling, *Journal Of Allergy and Clinical Immunology*, 117, 5, 979-987.
  70. Takeda, K. Ve Akira, S., 2004. TLR signaling pathways. In *Seminars in Immunology*, 16, 1, 3-9.
  71. Kaisho, T. ve Akira, S., 2006. Toll-like receptor function and signaling, *Journal Of Allergy and Clinical Immunology*, 117, 5, 979-987.
  72. Jin, M. S. ve Lee, J. O., 2008. Structures of TLR-ligand complexes, *Current Opinion in Immunology*, 20, 4, 414-419.
  73. Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. ve Beutler, B., 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene, *Science*, 282, 5396, 2085-2088.
  74. Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L. ve Aderem, A., 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 25, 13766-13771.
  75. Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, L. R. ve Akira, S., 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins, *The Journal of Immunology*, 169, 1, 10-14.
  76. Ohto, U., Fukase, K., Miyake, K. Ve Satow, Y., 2007. Crystal structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid IVA, *Science*, 316, 5831, 1632-1634.
  77. Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Eugene, C. Y., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M. ve Aderem, A., 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5, *Nature*, 410, 6832, 1099-1103.
  78. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. ve Flavell, R. A., 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF $\kappa$ B by Toll-like receptor 3, *Nature*, 413, 6857, 732-738.
  79. Lund, J. M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N. C., Gale, N. W., Iwasaki, A. ve Flavell, R. A., 2004. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7, *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 101, 15, 5598-5603.
  80. Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. Ve Akira, S., 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408, 6813, 740-745.
  81. Lim, K. H., Staudt, L. M. ve 2013. Toll-like receptor signaling, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5, 1, a011247.
  82. Wang, Y., Song, E., Bai, B. ve Vanhoutte, P. M., 2016. Toll-like receptors mediating vascular malfunction: Lessons from receptor subtypes, *Pharmacology & Therapeutics*, 158, 91-100.

83. Smith, S. M., 2014. Role of Toll-like receptors in *Helicobacter pylori* infection and immunity, *World J Gastrointest Pathophysiol*, 5, 3, 133-146.
84. Könnér, A. C. ve Brüning, J. C., 2011. Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism, *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 22, 1, 16-23.
85. Wang, J. Q., Jeelall, Y. S., Ferguson, L. L. ve Horikawa, K., 2014. Toll-like receptors and cancer: MYD88 mutation and inflammation, *Frontiers in Immunology*, 5.
86. Huang, W. C. ve Hung, M. C., 2013. Beyond NF $\kappa$ B activation: nuclear functions of I $\kappa$ B kinase  $\alpha$ , *Journal of Biomedical Science*, 20, 1, 3.
87. Mantovani, A. ve Garlanda, C., 2006. Inflammation and multiple myeloma: the Toll connection, *Leukemia*, 20, 937-938.
88. Hideshima, T., Richardson, P. ve Anderson, K. C., 2003. Novel therapeutic approaches for multiple myeloma, *Immunological reviews*, 194, 1, 164-176.
89. Seidl, S., Kaufmann, H. Ve Drach, J., 2003. New insights into the pathophysiology of multiple myeloma, *The Lancet Oncology*, 4, 9, 557-564.
90. Anderson, K. C., Shaughnessy, Jr. J. D., Barlogie, B., Harousseau, J. L. ve Roodman, G. D., 2002. Multiple myeloma, *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, 214-240.
91. Brenne, A. T., Ro, T. B., Waage, A., Sundan, A., Borset, M. ve Hjorth-Hansen, H., 2002. Interleukin-21 is a growth and survival factor for human myeloma cells, *Blood*, 99, 10, 3756-3762.
92. Lauta, V. M., 2003. A review of the cytokine network in multiple myeloma, *Cancer*, 97, 10, 2440-2452.
93. Guay, H. M., Andreyeva, T. A., Garcea, R. L., Welsh, R. M. ve Szomolanyi-Tsuda, E., 2007. MyD88 is required for the formation of long-term humoral immunity to virus infection, *The Journal of Immunology*, 178, 8, 5124-5131.
94. Shapiro-Shelef, M., Lin, K. I., Savitsky, D., Liao, J. ve Calame, K., 2005. Blimp-1 is required for maintenance of long-lived plasma cells in the bone marrow, *Journal of Experimental Medicine*, 202, 11, 1471-1476.
95. González-Reyes, S., Marín, L., González, L., González, L. O., del Casar, J. M., Lamelas, M. L., González-Quintana, J. M. ve Vizoso, F. J., 2010. Study of TLR3, TLR4 and TLR9 in breast carcinomas and their association with metastasis, *BMC Cancer*, 10, 1, 665.
96. Park, H. D., Lee, Y., Oh, Y. K., Jung, J. G., Park, Y. W., Myung, K., Kim, K. H., Koh, S. S. ve Lim, D. S., 2011. Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor promotes metastasis by regulating TLR/CXCR4 activation, *Oncogene*, 30, 2, 201-211.
97. Sato, Y., Goto, Y., Narita, N. Ve Hoon, D. S., 2009. Cancer cells expressing toll-like receptors and the tumor microenvironment, *Cancer Microenvironment*, 2, 1, 205-214.
98. Sheyhidin, I., Nabi, G., Hasim, A., Zhang, R. P., Ainiwaer, J., Ma, H. Ve Wang, H., 2011. Overexpression of TLR3, TLR4, TLR7 and TLR9 in esophageal squamous cell carcinoma, *World J Gastroenterol*, 17, 32, 3745-3751.
99. Tewari, R., Choudhury, S. R., Ghosh, S., Mehtap, V. S. ve Sen, E., 2012. Involvement of TNF $\alpha$ -induced TLR4-NF $\kappa$ B and TLR4-HIF-1 $\alpha$  feed-forward loops in the regulation of inflammatory responses in glioma, *Journal of Molecular Medicine*, 90, 1, 67-80.

100. Parsonnet, J., Friedman, G.D., Vandersteen, D. P., Chang, Y., Vogelman, J. H., Orentreich, N. ve Sibley, R., 1991. *Helicobacter pylori* Infection and the Risk of Gastric Carcinoma, *New England Journal of Medicine*, 325, 16, 1127-1131.
101. El-Serag, H. B., 2012. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma, *Gastroenterology*, 142, 6, 1264 –1273.
102. Srikrishna, G. ve Freeze, H. H., 2009. Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer, *Neoplasia*, 11, 7, 615-628.
103. Wolska, A., Lech-Marańda, E. Ve Robak, T., 2009. Toll-like receptors and their role in carcinogenesis and anti-tumor treatment, *Cellular and Molecular Biology Letters*, 14, 2, 248-272.
104. Maruyama, K., Selmani, Z., Ishii, H. Ve Yamaguchi, K., 2011. Innate immunity and cancer therapy, *International immunopharmacology*, 11, 3, 350-357.
105. Basith, S., Manavalan, B., Yoo, T. H., Kim, S. G. ve Choi, S., 2012. Roles of toll-like receptors in cancer: a double-edged sword for defense and offense, *Archives of Pharmacal Research*, 35, 8, 1297-1316.
106. Coley, W. B., 1991. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas, With a report of ten original cases, *Clin Orthop Relat Res* , 262, 3–11.
107. Tartey, S. ve Takeuchi, O., 2017. Pathogen recognition and Toll-like receptor targeted therapeutics in innate immune cells, *International Reviews of Immunology*, 1-17.
108. Cai, Z., Sanchez, A., Shi, Z., Zhang, T., Liu, M. ve Zhang, D., 2011. Activation of Toll-like receptor 5 on breast cancer cells by flagellin suppresses cell proliferation and tumor growth, *Cancer Research*, 71, 7, 2466-2475.
109. Burdelya, L. G., Krivokrysenko, V. I., Tallant, T. C., Strom, E., Gleiberman, A. S., Gupta, D., Kurnasov, O. V., Fort, F. L., Osterman, A. L., DiDonato, J. A., Feinstein, E. Ve Gudkov, A. V., 2008. An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models, *Science*, 320, 5873, 226-230.
110. Krieg, A. M., 2006. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation, *Nature reviews Drug discovery*, 5, 6, 471-484.
111. Hawley, T. S., Riz, I., Yang, W., Wakabayashi, Y., DePalma, L., Chang, Y. T., Peng, W., Zhu, J ve Hawley, R. G., 2013. Identification of an ABCB1 (P-glycoprotein)-positive carfilzomib-resistant myeloma subpopulation by the pluripotent stem cell fluorescent dye CDy1, *American Journal of Hematology*, 88, 4, 265-272.
112. Allegra, A., Penna, G., Alonci, A., Russo, S., Greve, B., Innao, V., Minardi, V. ve Musolino, C., 2013. Monoclonal antibodies: potential new therapeutic treatment against multiple myeloma, *European Journal of Hematology*, 90, 6, 441-468.
113. Makkouk, A. ve Abdelnoor, A. M., 2009. The potential use of Toll-like receptor (TLR) agonists and antagonists as prophylactic and/or therapeutic agents, *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 31, 3, 331-338.
114. Weigel, B. J., Cooley, S., DeFor, T., Weisdorf, D. J., Panoskaltsis-Mortari, A., Chen, W., Blazar, B. R. ve Miller, J. S., 2012. Prolonged subcutaneous administration of 852A, a novel systemic toll-like receptor 7 agonist, to

- activate innate immune responses in patients with advanced hematologic malignancies, *American Journal of Hematology*, 87, 10, 953-956.
115. Ray, A., Tian, Z., Das, D. S., Coffman, R. L., Richardson, P., Chauhan, D. ve Anderson, K. C., 2014. A novel TLR-9 agonist C792 inhibits plasmacytoid dendritic cell-induced myeloma cell growth and enhance cytotoxicity of bortezomib, *Leukemia*, 28, 8, 1716-1724.
  116. Shchebliakov, D. V., Logunov, D. Y., Tikhvatulin, A. I., Shmarov, M. M., Naroditsky, B. S. ve Ginzburg, A. L., 2010. Toll-like receptors (TLRs): the role in tumor progression, *Acta Naturae*, 2, 3, 6.
  117. Doyle, A. ve Griffiths, J.B., 1998. *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*, John Wiley & Sons: John Wiley & Sons, 57-61, 62-64.
  118. URL-2 < <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/references/gibco/cell-culture-basics/cell-culture-protocols.html> > , alındığı tarih : 20.05.2016.
  119. Zhong, X., Xiong, M., Meng, X. Ve Gong, R., 2010. Comparison of the multi-drug resistant human hepatocellular carcinoma cell line Bel-7402/ADM model established by three methods, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 29, 1, 115.
  120. URL3 < [http://plantbio.okstate.edu/resources/files/Roche\\_RT-PCR\\_Manual.pdf](http://plantbio.okstate.edu/resources/files/Roche_RT-PCR_Manual.pdf) > , alındığı tarih: 06. 06. 2016.
  121. Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A. ve Zoric, N., 2006. The real-time polymerase chain reaction, *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 2, 95-125.
  122. Shipley, G. L., 2006. *An introduction to real-time PCR*, Real Time PCR Taylor & Francis Group. p: 1-38, Dorak MT, ed, USA.
  123. Ponchel, F., 2006. *Real-time PCR using SYBR® Green*. Real Time PCR Taylor & Francis Group. p: 139-154, Dorak MT, ed, USA.
  124. URL-4 < <https://en.wikipedia.org/wiki/TaqMan> > , alındığı tarih: 06.06.2016.
  125. Livak, K. J. ve Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25, 4, 402-408.
  126. Ellyard, J. I., Simson, L. ve Parish, C. R., 2007. Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe, *Tissue Antigens*, 70, 1, 1-11.
  127. Wyllie, D. H., Kiss-Toth, E., Visintin, A., Smith, S. C., Boussouf, S., Segal, D. M., Duff and, G. W. ve Dower, S. K., 2000. Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses, *The Journal of Immunology*, 165, 12, 7125-7132.
  128. Huang, B., Zhao, J., Unkeless, J. C., Feng, Z. H. Ve Xiong, H., 2008. TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword, *Oncogene*, 27, 2, 218-224.
  129. Li, H., He, K. L., Chen, Y., Mayer, L., Unkeless, J. C. ve Xiong, H., 2005. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance, *Cancer Research*, 65, 12, 5009-5014.
  130. Bao, H., Lu, P., Li, Y., Wang, L., Li, H., He, D., Yang, Y., Zhao, Y., Yang, Li., Wang, M., Yi, Q. Ve Cai, Zhen., 2011. Triggering of toll-like receptor-4 in human multiple myeloma cells promotes proliferation and alters cell responses to immune and chemotherapy drug attack, *Cancer biology & therapy*, 11, 1, 58-67.

131. Jego, G., Bataille, R., Geffroy-Luseau, A., Descamps, G. Ve Pellat-Deceunynck, C., 2006. Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for humanmyeloma cells through Toll-like receptors, *Leukemia*, 20, 6, 1130-1137.
132. Abdi, J., Mutis, T., Garssen, J. ve Redegeld, F. A., 2014. 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*, 9, 5, e96608.
133. Reynolds, J. M., Martinez, G. J., Chung, Y. ve Dong, C., 2012. Toll-like receptor 4 signaling in T cells promotes autoimmune inflammation, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 32, 13064-13069.
134. Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdörfer, B., Giese, T. ve Hartmann, G., 2002. Quantitative expression of toll-like receptor 1–10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides, *The Journal of Immunology*, 168, 9, 4531-4537.
135. Chiron, D., Pellat-Deceunynck, C., Amiot, M., Bataille, R. ve Jigo, G., 2009. TLR3 ligand induces NF- $\kappa$ B activation and various fates of multiple myeloma cells depending on IFN- $\alpha$  production, *The Journal of Immunology*, 182, 7, 4471-4478.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı ve Soyadı** :Mehtap TARHAN

**Doğum Tarihi ve Yeri:** Aksaray/Merkez

**E-posta adresi** :mehtaptarhan68@gmail.com

### EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

**Lisans** :Aksaray Üniversitesi Sabire Yazıcı Fen Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Bölümü (2010-2014)

**Yüksek Lisans** :Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji  
Anabilim Dalı (2014- )