

**Multipl Myelomda Proteozom İnhibisyonu-Tabanlı Kombine
Tedavinin Etkinliği**

Program Kodu: 1002

Proje No: 114S905

Proje Yürütücüsü:

Yard. Doç. Dr. G. Ozan ÇETİN

Arařtirmacı:

Yard. Doç. Dr. Sibel KABUKÇU HACIOĞLU

ÖNSÖZ

Multipl myelom (MM), antikor üreten plazma hücrelerinin malign transformasyonu sonucu oluşan bir kanser türüdür. Primer MM tedavisindeki ilerlemelere rağmen, MM hala tedavi edilemeyen bir hastalıktır ve MM'de daha etkin sonuçlar için kombinasyon tedavileri ile ilgili daha fazla prelinik çalışmalara gereksinim vardır.

MM tedavisinde protezom inhibitörü olan bortezomib (BTZ)-tabanlı kombine tedavilerle ilgili prelinik çalışmaların sonuçları, bu kombinasyonların klinik etkinliklerinin beklenenden daha az olduğu göstermektedir. Bu nedenle yeni tedavi ajanlarının dahil edildiği kombinasyon denemelerine gereksinim vardır.

BTZ, bafilomisin (BAF), vorinostat (SAHA) ve 5-azasitidin (5-AzaC)'i içeren protezom inhibisyonu-tabanlı kombine tedavinin MM hücre sitotoksitesi üzerinde etkinliği ve bu etkinliğin hangi programlı hücre ölümü/ölümleri üzerinden gerçekleştiği tam olarak bilinmemektedir. Bu projede, BTZ, BAF, SAHA ve 5-AzaC'nin, MM hücre sitotoksitesinde sinerjik etki göstererek daha güçlü tedavi yanıtların elde edilmesini sağlayıp sağlamadıkları ve epigenetik modülasyonu da içeren bu 4'lü protezom inhibisyonu-tabanlı kombine tedavinin, ER stresi-ile ilişkili apoptozu ve/veya otofajiyi arttırarak daha güçlü tedavi yanıtları oluşturup oluşturmadıklarının araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla hazırlanan ve tamamlanan "*Multipl Myelomda Protezom İnhibisyonu-Tabanlı Kombine Tedavinin Etkinliği*" başlıklı proje TÜBİTAK tarafından 15/01/2015 tarihinde 114S905 no'lu Hızlı Destek Projesi olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Özet	v
Abstract	vi
Giriş	1
Literatür özeti	3
Gereç ve Yöntem	8
Bulgular	15
Tartışma/Sonuç	21
Kaynaklar	25

TABLO LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1. MM hücre hatları ve özellikleri	8
Tablo 2. <i>CHOP</i> , <i>XBP1</i> genleri ve β - <i>aktin</i> mRNA ekspresyon analizlerinde kullanılan özgün primer dizilimleri (5'→3')	13
Tablo 3. <i>CHOP</i> , <i>XBP1</i> ve β - <i>aktin</i> genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyonlarını belirlemek amacı ile hazırlanan reaksiyon karışımı	13
Tablo 4. <i>CHOP</i> , <i>XBP1</i> ve β - <i>aktin</i> genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyonlarını belirlemek amacı ile uygulanan gerçek-zamanlı PCR protokolü	14
Tablo 5. Projede kullanılan ajanların IC ₅₀ değerleri	15
Tablo 6. Annexin V-flow sitometri sonuçları	16

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1. Araştırmada uygulanan sitotoksisite testinin deney protokolü	9
Şekil 2. MM hücre hatlarında sitotoksik ajan uygulaması sonrası Annexin V- flow sitometri görüntüleri	16
Şekil 3. MM hücre hatlarında sitotoksik ajan uygulaması sonrası kaspaz-3 ve kaspaz-7 western blotlama görüntüleri	17
Şekil 4. Bafilomisin A uygulanan RPMI8226 hücrelerinde fluoresan mikroskopta akridin oranj boyaması ile asidik veziküllerin görünümü	17
Şekil 5. Akridin oranjla boyanan U266B1 hücreleri	18
Şekil 6. Akridin oranjla boyanan RPMI 8226 hücreleri	18
Şekil 7. MM hücre hatlarında sitotoksik ajan uygulaması sonrası Beclin-1 ve LC3 western blotlama görüntüleri	19
Şekil 8. U266B1 MM hücre hattında <i>CHOP</i> ve <i>XBP1</i> gen ekspresyonları	19
Şekil 9. RPMI 8226 MM hücre hattında <i>CHOP</i> ve <i>XBP1</i> gen ekspresyonları	20

ÖZET

Multipl myelom (MM), antikor üreten plazma hücrelerinin malign transformasyonu sonucu oluşan bir kanser türüdür. Primer MM tedavisindeki ilerlemelere rağmen, MM hala tedavi edilemeyen bir hastalıktır ve MM'de daha etkin sonuçlar için kombinasyon tedavileri ile ilgili daha fazla prelinik çalışmalara gereksinim vardır.

MM tedavisinde proteazom inhibitörü olan bortezomib (BTZ)-tabanlı kombine tedavilerle ilgili prelinik çalışmaların sonuçları, bu kombinasyonların klinik etkinliklerinin beklenenden daha az olduğunu göstermektedir. Bu projede BTZ, vorinostat (SAHA), 5-azasitidin (5-AzaC) ve bafilomisin (BAF)'i içeren proteazom inhibisyonu-tabanlı kombine tedavinin MM hücre sitotoksitesi üzerinde etkinliğini değerlendirmeyi ve bu etkinliğin hangi programlı hücre ölümü/ölümleri üzerinden gerçekleştiğini belirlemeyi amaçladık

Proje kapsamında öncelikle U266B1 ve RPMI 8226 MM hücre dizilerinde BTZ, SAHA, 5-AzaC ve BAF ajanlarının tek tek ve dördü kombinasyon IC₅₀ değerleri belirlendi. Kullanılan ajanların MM hücre dizilerinde sitotoksik etkilerinin apoptoz ve otofaji açısından değerlendirilmesi amacıyla Annexin V boyamasıyla flow sitometri ve kaspaz-3 ve kaspaz-7 proteinlerine yönelik western blotlama yöntemleri kullanıldı. Otofaji açısından ise akridin oranj boyasıyla floresan mikroskopik analiz ve LC3 ve beclin-1 proteinlerinin western blot analizi uygulandı. Son olarak hücre dizilerindeki sitotoksitenin endoplazmik retikulum (ER) stresi ile ilişkisi açısından *CHOP* ve *XBP1* genlerinin ekspresyon analizleri kantitatif gerçek zamanlı PCR ile gerçekleştirildi.

BTZ, BAF, SAHA ve 5-AzaC'dan oluşan dördü kombinasyon tedavisi, protein degradasyon sistemlerinin eş zamanlı baskılanmasına yol açarak MM hücrelerinde ER stresini artırmaktadır. Bu da CHOP gibi ER-stresi aracılı apoptotik sinyallerin aktivasyonuna neden olarak, MM'da güçlü bir biçimde apoptozu uyarır.

BTZ, SAHA, 5-AzaC ve BAF'ı içeren proteozom inhibisyonu-tabanlı kombine tedavinin MM hücre sitotoksitesi üzerinde etkinliğini değerlendirmeyi hedefleyen bu prelinik çalışmadan elde edilen veriler, özellikle relaps/refraktör MM hastalarının tedavisinde alternatif yeni yaklaşımları sunması ve *in vivo* çalışmaları kapsayan yeni projelerin oluşturulmasına olanak sağlaması açısından önemli olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Multipl myelom, bortezomib, ER-stresi, otofaji, apoptoz

ABSTRACT

Multiple myeloma (MM) is the malign transformation of the antibody producing plasma cells. Although novel treatment strategies emerge, MM still lacks complete treatment. More preclinical studies are needed for effective combined treatment strategies.

Preclinical studies regarding the effects of a proteasome inhibitor, bortezomib (BTZ)-based combination therapies show that the clinical responses of these treatments are lower than expected. In this study we aimed to evaluate the efficiency of proteasome inhibition-based combination therapy including BTZ, vorinostat (SAHA), 5-azacitidine (5-AzaC) and bafilomycin (BAF) on MM cell cytotoxicity and to demonstrate the underlying programmed cell death.

First we detected the IC₅₀ levels of the drugs over U266B1 and RPMI 8226 MM cell lines alone and in combination. The cytotoxicity of the drugs in terms of apoptosis or autophagy was determined by flow cytometry analysis using Annexin V staining and western blotting of caspase-3 and 7 proteins. Fluorescent microscopy analysis by acridine orange staining and western blotting for LC3 and beclin-1 was used for evaluation of autophagy. Real-time polymerase chain reaction was used for the expression analysis of *XBP1* and *CHOP* genes regarding the endoplasmic reticulum (ER) stress related to cytotoxicity.

The combination therapy including BTZ, BAF, SAHA and 5-AzaC leads to simultaneous inhibition of protein degradation systems and results in ER stress induced apoptosis. Our results are important, especially in cases of relapsing/refractory MM, since they present alternative treatment approaches and new projects regarding the *in vivo* efficiency of combination therapies may be developed.

Keywords: Multiple myeloma, bortezomib, ER-stress, autophagy, apoptosis

GİRİŞ

Multipl myelom (MM), antikor üreten plazma hücrelerinin malign transformasyonu sonucu oluşan bir kanser türüdür. Primer MM tedavisindeki ilerlemelere rağmen, MM hala tedavi edilemeyen bir hastalıktır ve MM'de daha etkin sonuçlar için kombinasyon tedavileri ile ilgili daha fazla prelinik çalışmalara gereksinim vardır.

Uzun bir süredir Multipl Myelom (MM)'da en önemli tedavi stratejilerinden biri de proteozom inhibisyonudur. Klinik olarak yaklaşık 10 yıldır proteozom inhibitörü olarak bortezomib (BTZ) ve BTZ-tabanlı kombine tedaviler kullanılmaktadır. Konvansiyonal tedavi ile karşılaştırıldığında, BTZ içeren kombine tedaviler her ne kadar daha iyi sonuçların elde edilmesine olanak sağlamışsa da, MM ortalama 3-6 yıl sağkalım süresi ile hala tedavi edilemeyen bir hastalıktır. Bu nedenle, daha etkin tedavi olanaklarının araştırılması kritik öneme sahiptir.

MM'nin patogeneğinde Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ B)'nin sürekli aktif olması önemli yer tutmaktadır. Bu aktivite en azından anti-apoptotik proteinlerin uyarımına neden olarak, hem MM hücrelerinin sağkalımında hem de kemoterapi ve radyoterapiye dirençte rol oynamaktadır. NF- κ B inhibitörü olan I κ B'nin proteozom için bir substrat olmasından yola çıkarak, başlangıçta MM tedavisinde BTZ kullanımında asıl hedef NF- κ B'yi inhibe etmektir. Ancak son yıllardaki çalışmalar, BTZ'nin MM ve lenfoma hücrelerinde NF- κ B'nin kanonikal yolağını aktive ettiğini, böylelikle BTZ'nin terapotik etkisinin NF- κ B aktivitesinin inhibisyonu olmadığını göstermiştir. BTZ-aracılı sitotoksitenin altında yatan moleküler mekanizmalar araştırıldığında, son yıllardaki raporlar MM hücrelerinde BTZ-ile uyarılan sitotoksitenin bir diğer moleküler mekanizmasının BTZ'ye yanıtla oluşan ER-stresi olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, son yıllarda BTZ'nin MM hücrelerinde ER-stresi kadar otofajiyi de uyardığı gösterilmiştir. Bu veriler, otofaji-lizozom sistemi ile ubikutin-proteozom sistemi ve ER-stresi arasında direkt bir ilişkinin varlığını göstermektedir. Dolayısıyla, BTZ'nin yanısıra bu alternatif yolları hedefleyen ajanların kombine kullanımlarının, MM hücrelerinde daha güçlü sitotoksik etkiye sahip olabilecekleri düşünülmektedir. Bu amaçla, günümüze değin birçok farklı yolları hedefleyen ajanlarla farklı kombinasyon tedavilerini değerlendiren birçok prelinik çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmalardan bazılarında klinik çalışmalar devam etmektedir.

Ne yazık ki, birçok farklı yolağı hedefleyen kombine tedavi yaklaşımlarında her ne kadar in vitro olarak sinerjik etkiler gözlemlense de, bu kombinasyonların klinik etkinliklerinin beklenenden daha az olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle yeni tedavi ajanlarının dahil edildiği alternatif

kombinasyon denemelerine gereksinim vardır. Bu gerekçeden yola çıkarak, proje önerimizde ubikutin-proteozom sistemini hedefleyen BTZ, otofaji-lizozom sistemini hedefleyen BAF, epigenetik modülasyonu hedefleyen histon deasetilaz inhibitörü olan SAHA ve DNA demetile edici ajan olarak 5-AzaC'nin kombine kullanımlarının MM hücre sitotoksitesi üzerindeki etkinliğini belirlemeyi amaçladık. Söz konusu hedeflerin farklı kombinasyonlarına ait farklı veriler bulunmakla birlikte, bilgilerimiz dahilinde literatürde bu hedefleri içeren kombinasyonlara ait herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

LİTERATÜR ÖZETİ

Multipl myelom (MM), antikor üreten plazma hücrelerinin malign transformasyonu sonucu oluşan bir kanser türüdür ve malign neoplazmi oluşturan plazma hücreleri kemik iliğinde birikerek, kemik ve kemik iliği fonksiyonlarını etkiler (Kyle vd., 2003). Plazma hücrelerinin sayısal artışı ile karakterize bu hastalığın tanı belirteçleri hiperkalsemi, renal hastalık, anemi ve osteolitik kemik lezyonları (CRAB)'dır.

MM, aşırı somatik hipermutasyon ve antijen seçimi ile karakterize bir post-germinal merkez tümürüdür (Demchenko ve Kuehl, 2010). Hematolojik malignensilerin %10'undan fazlasını ve diğer malignensilerin de yaklaşık %1'ini oluşturur. MM riski yaşla birlikte artar ve erkeklerde görülme oranı kadınlara göre daha yüksektir. Radyasyon ve çeşitli kimyallara mesleki maruziyetlerin hastalık riskini arttırdığı düşünülmektedir. Bunun yanısıra anlamı belirsiz monoklonal gamopati (MGUS) ve soliter plazmasitom gibi plazma hücre hastalıkları da MM'ye dönüşebilir (American Cancer Society, 2010).

MM, tam olarak tedavi edilebilir bir hastalık değildir (Anderson, 2011; Bird vd., 2011; Laubach vd., 2011). Proteozom inhibitörü olan bortezomib (Velcade®), MM tedavisinde kullanılmak üzere 2006 yılında FDA'den onay almıştır (Kane vd., 2006). MM patogeneğinde NF- κ B'nin sürekli aktivasyonu önemli bir rol oynadığından ve NF- κ B'nin inhibitörü olan I κ B, proteozomun bir substratı olduğundan, başlangıçta MM tedavisinde BTZ, NF- κ B'yi inhibe etmek amacı ile kullanılmıştır (Hideshima vd., 2002; Berenson vd., 2001). Ancak sonraki yıllardaki raporlar MM hücrelerinde BTZ-ile uyarılan sitotoksitenin bir diğer moleküler mekanizmasının BTZ'ye yanıtla oluşan endoplazmik retikulum (ER) stresi olduğunu göstermektedir (Meister vd., 2007; Obeng vd., 2006). MM'nin özgün biyolojik özelliklerinden biri de monoklonal Ig üretimidir. IgG-sekrete eden insan MM hücre hattı JK6 ile yapılan bir çalışmada, proteozom inhibitörlerinin tercihen ER'de katlanmamış (unfolded) protein birikimi ile karakterize, yüksek Ig sentez oranına sahip hücrelerde apoptozu uyardıkları belirlenmiştir (Meister vd., 2007). Bu veriler, diğer kanser türleri ile karşılaştırıldığında BTZ'nin MM tedavisinde tercihan kullanım sebebini açıklayabilmektedir ve MM hücrelerinde, BTZ'nin sitotoksik etkisinin ER-aracılı apoptoz olduğunu göstermektedir (Meister vd., 2007; Obeng vd., 2006).

ER stresi, ER lümenindeki katlanmamış (unfolded) veya yanlış katlanmış (misfolded) protein miktarı ile bu proteinleri doğru biçimde katlayacak ER mekanizmasının kapasitesi arasındaki dengesizliktir (Ron ve Walter 2007). BTZ aracılığı ile 26S proteozom inhibisyonunun ER'de yanlış katlanmış (misfolded) proteinlerde artışa neden olduğuna dair birçok veri

bulunmaktadır (Meister vd., 2007; Obeng vd., 2006; Kawaguchi vd., 2011; PeriyasamyThandavan vd., 2010; Fels vd., 2008; Ri vd., 2010). Bu durum, Unfolded Protein Response (UPR) ile koordineli olarak sonuçta ER'de strese neden olur. UPR'nin temel fonksiyonu translasyon oranının supurasyonu ile ER'ye giren protein miktarını azaltmak veya şaperon proteinlerinin translasyonunu ile katlanma kapasitesini arttırmaktır. Aynı zamanda, eğer proteinler ER'de doğru biçimde katlanmazlarsa, ubiquitin-proteozom yolu ile degradasyon için tekrar sitoplazmaya gönderilirler ki bu mekanizma ER-ile ilişkili degradasyon (ERAD) olarak adlandırılır. Eğer adaptasyon için bu stresin üstesinden gelinemezse, proapoptotik transkripsiyon faktörü CHOP ile ve kaspaz 12 sinyal iletiminde yer alan IRE1 ile apoptoz başlar (Ron ve Walter, 2007; Herr ve Debatin, 2001; Verfaillie vd., 2010). Böylece BTZ ve diğer ajanlar kullanılarak bu yolağın terapötik manipülasyonu, yüksek protein yükleri ve hücre stresle ilgilenme yeteneği ile interfere olabilir ve MM hücre ölümü ile sonuçlanabilir (Kawaguchi vd., 2011; Fels vd., 2008).

Klinik denemelerde MM için BTZ ile önemli klinik yararlar sağlanmış olsa da toksik yan etkiler ve direnç gelişimi nedeniyle etkinliği ve uygulaması ile kısıtlılıklar bulunmaktadır (Oakervee vd., 2005; Richardson vd., 2005; Oerlemans vd., 2008; Smith vd., 2011). Bu nedenle BTZ'nin etkinliğini arttıracak ve/veya toksik etkilerini azaltacak yeni kombinasyon stratejilerinin araştırılmasına gereksinim vardır. Daha fazla klinik aktivite elde etmek amacı ile, son yıllarda çoğunlukla proteozom inhibisyonu-tabanlı kombinasyonlar araştırılmıştır (Kubicek vd., 2009; Lancet vd., 2011; Su vd., 2010; Badros vd., 2009). Preklinik çalışmalarda identifiye edilen aday ajanlar arasında, preklinik MM modellerinde ve diğer insan solid tümörlerinde proteozom inhibitörleri ve HDAC inhibitörleri kombinasyonlarının daha güçlü ve sinerjik sitotoksositeye neden oldukları belirlenmiştir (Pei vd., 2004; Lin vd., 2009).

Hücre döngüsünden kaçış ve apoptoz gibi birçok normal hücrel olaylar, histon ve histon olmayan proteinlerle ve bu proteinlerin asetilasyonu ile regüle edilirler. Bu fizyolojik hücrel mekanizmaların birçoğu tümör hücrelerinde düzensizdir. Proteinlerin asetilasyon durumu, birbirine zıt etkili histon asetiltransferaz (HAT)'lar ve histon deasetilaz (HDAC)'larla düzenlenir (Jazirehi, 2011; Frew vd., 2009; Marks ve Xu, 2009). T-hücre lenfoması ve Hodgkin lenfomada normal doku ile karşılaştırıldığında HDAC'ların ekspresyonlarında artış olduğu ve bu artışın daha agresif seyir ve zayıf tedavi etkinliği ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Adams vd., 2010; Marquard vd., 2009). HDAC inhibitörleri (HDACI), protein asetilasyonu üzerindeki çeşitli etkileri nedeniyle tümör hücrelerini ve bu hücrelerin lokal mikroçevresi ile olan etkileşimlerini hedef alır. Böylece kanserde regülasyonu bozulan hücrel mekanizmaları ve sinyal iletim yollarını modüle eder (Bolden vd., 2006; Dokmanovic vd., 2007). HAT ve HDAC'ların aktivitesi kanser gelişiminde yer alan yollarda rol oynayan

birçok hücrel aktiviteyi kontrol ederler. Kor histonların N-terminal kuyruklarında, HAT'lar ε-amino lizin rezidülerini asetiller ve transkripsiyonal aktivasyonla ilişkili açık kromatin konformasyonunu oluşturur, oysa HDAC'lar α-asetil lizin rezidülerini deasetile eder ve transkripsiyonal baskılanma ile ilişkili kapalı kromatin konformasyonunu oluşturur (Dokmanovic vd., 2007; Yang ve Seto, 2007; Glozak ve Seto, 2007). Aynı zamanda HDAC'lar non-histon proteinlere (Örneğin p53, HIF1α, E2F ve NF-κB gibi transkripsiyon faktörleri) de bağlanırlar, onları deasetile ederler ve aktivitelerini düzenlerler (Bolden vd., 2006). HDAC'lar, HDAC'ların katalitik bölgesine bağlanır, hedef histon üzerindeki HDAC aktivitesini önler, histon kodunu değiştirir ve sonuçta transkripsiyon faktörlerinin promoter bölgesine ulaşılabilirliğini sağlarlar. Aynı zamanda HDAC'lar, transkripsiyonun modülasyonunda rol oynayan non-histon moleküler hedefleri de etkiler (Sasakawa vd., 2003; Lin vd., 2006). HDAC olan vorinostat (SAHA=suberoylanilide hydroxamic acid) ve trikostatın A'nın hücre döngüsünde durmayı uyararak ve G1 fazının negatif regülatörlerini (p21'ler gibi) upregüle ederek insan MM hücre hatlarında sitotoksik etki oluşturdukları gösterilmiştir (Fandy vd., 2005). Normal hücrel fonksiyon için protein asetilasyonu ve deasetilasyonu arasındaki denge kritiktir ve HDAC'ları, farklı ve önemli biyolojik etkilere sahip histon ve histon-olmayan proteinlerin (ki bunlar kanserde şiddetle etkilenen moleküller olabilir) asetilasyonunun regülasyonunda önemli rol oynarlar.

Antimyeloma aktiviteli olduğu gösterilen ilk HDAC da, vorinostattır. Vorinostat (SAHA), agrezomal protein degradasyonunu bloke edebilen bir oral HDAC'dır ve 2006 yılında kutanöz T-hücre lenfomalı bireylerin tedavisinde kullanım için onay almıştır (Mann vd., 2007). Vorinostat monoterapisi, hem solid hem de hematolojik kanserli bireylerin tedavisinde kabul edilebilir bir güvenlik profiline sahiptir (Kelly vd., 2005; O'Conner vd., 2006; Richardson vd., 2008). Hem hücre hatlarında hem de diğer B-hücre malignensili bireylerden alınan hasta kökenli hücrelerde aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Mitsiades vd., 2003). Sonraki yıllarda SAHA'nın anti-MM etkisi daha iyi karakterize edilmiş ve SAHA'ya maruz kalan MM hücrelerinin moleküler profilinin, MM patofizyolojisinde yer alan insülin-benzeri büyüme faktör reseptörü ve IL-6 reseptörü sinyal iletim kaskad üyelerinin, onkogenik kinazların, DNA sentez/tamir enzimlerinin ve transkripsiyon faktörlerinin (XBP-1 ve E2F-1 gibi) transkriptlerinin downregülasyonu kapsayan antiproliferatif ve/veya proapoptotik moleküler olayların birlikteliğini içerdiği gösterilmiştir. Bir başka önemli bulgu da SAHA'nın proteozom alt ünitelerinin ekspresyonu kadar proteozom aktivitesini de baskıladığının belirlenmesidir, ve böylece SAHA, MM hücrelerinin BTZ ile proteozom inhibisyonuna olan duyarlılıklarını arttırmaktadır (Carew vd., 2008; Mitsiades vd., 2004). Aynı zamanda bir faz 2 çalışması, vorinostat ve BTZ kombine tedavisinin (dekzametazonlu veya dekzametazonsuz) BTZ'ye refraktör olan relaps veya refraktör MM hastalarının yaklaşık %40'ında objektif bir yanıt

alındığını göstermiştir (Badros vd., 2009). Otuz bir ülkeden 174 üniversite hastanesinin katılımı ile gerçekleştirilen ve bir faz 3 çalışmasında (VANTAGE 088), BTZ'nin tek başına kullanımı ile karşılaştırıldığında vorinostat ve BTZ tedavi kombinasyonu ile daha yüksek yanıt oranlarının elde edildiği ve progresyon-free sağkalım ömrünün daha uzun olduğu gösterilmiştir (Dimopoulos vd., 2013). Yukarıda tartışılan veriler doğrultusunda, in vitro olarak HDAC'ları proteozom inhibitörleri ile sinerji gösterdikleri, günümüze kadar bu kombinasyonların klinik etkinliklerinin beklenenden daha az olduğu ispatlanmıştır. Bu nedenle yeni tedavi ajanlarının dahil edildiği kombinasyon denemelerine gereksinim vardır.

5-azasitidin (5-AzaC), DNA metilasyon inhibitörü olarak geliştirilen sitozin analogları sınıfına ait bir ajandır ve MSD, AML ve MM gibi hematolojik hastalıklarda klinik etkinlikleri gösterilmiştir (Bhalla, 2005; Kiziltepe vd., 2007). 5-AzaC'nin biyolojik aktivitesi, selüler DNA ve/veya RNA ile ilişkilidir. 5-AzaC'nin C6'sı ve DNA metiltransferaz (DNMT)'ların sistein tiolatı arasında kovalent bağ oluşur ve DNMT'lerin çalışması engellenir. Fizyolojik koşullarda, bu enzim-DNA/RNA kompleksi irreverzibl olarak oluşur, bu hücrelerde DNMT aktivitesi azalır ve sonuçta hücreSEL DNA'da demetilasyona neden olur. Bu durumun tümör sitotoksitesindeki rolü ile ilgili en önemli mekanizmalar arasında; i) Sessiz genlerin tekrar aktive olması ile birlikte hücreSEL DNA'nın demetilasyonu ve ii) İrreverzibl, kovalent enzim/DNA kompleksinin oluşması nedeniyle DNA hasarının uyarılmasıdır (Christman, 2002). MM ile ilgili yapılan bir çalışmada da, 5-AzaC'nin sağlıklı donör PBMC'ler için sitotoksik olmadığı, ancak MM hücrelerinde DNA çift-iplik kırık yanıtını ve sonuçta apoptozu uyardığı belirlenmiştir (Kiziltepe vd., 2007).

Bafilomisin A1 (BAF), bir makrolid antibiyotiktir ve başlangıçta bir proton pompa V-ATPazı selektif inhibe ettiği gösterilmiştir. Nanomolar konsantrasyonlarda BAF, veziküler proton gradientlerini bozar ve sonuçta asidik veziküllerin pH'sını artırır. BAF'a yanıt olarak veziküler asidifikasyonun bozulmasının lizozomla otofagozomların füzyonunu engellediği ve sonuç olarak da otofajiyi inhibe ettiği düşünülmektedir (Klionsky vd., 2008). Bir otofaji inhibitörü olan BAF'ın MM hücre hatlarında ER stresini artırarak BTZ-ile uyarılmış apoptozu arttırdığı bulunmuştur. U266 ve IM-9 olmak üzere 2 MM hücre hattı kullanıldığı bir çalışmada, BTZ'nin MM hücrelerinde ER stresi kadar otofajiyi de uyardıkları gösterilmiştir. Ek olarak, BAF'ın da proapoptotik CHOP (GADD153) ekspresyonunun upregülasyonu aracılığı ile ER stresini uyardığı belirlenmiştir. Aynı zamanda klaritromisin ve azitromisin gibi makrolid antibiyotiklerinin de otofaji akışını attenüe veya bloke ettiği gösterilmiştir (büyük olasılıkla lizozomal fonksiyonun inhibisyonu aracılığı ile). Aynı araştırmacılar, BTZ ve BAF arasında ER stresi kinetikleri arasında farklılıklar olduğu bulgusuna dayanarak da, CHOP uyarımı ile birlikte ER stresini maksimuma çıkarmak için BTZ'yi takiben BAF uygulaması ile ER-stresini

senkronize etmeye çalışmışlardır. Bu çaba, U266 hücrelerinde sitotoksiteyi arttırmıştır. Dolayısıyla, otofaji, proteozom ve ER stresi arasındaki ilişkinin kinetiğini kontrol etmenin, MM tedavisinin optimize edilmesinde önemli bir parametre olduğu sonucuna varmışlardır. Özetle bu çalışma, BTZ ve BAF kombine tedavisinin in vitro MM hücre ölümünü sinerjik olarak uyardığını göstermiştir (Kawaguchi vd., 2011). Diğer taraftan, yeni bulgular ER stresinin, otofajinin güçlü bir başlatıcısı olduğunu da göstermektedir (Høyer-Hansen ve Jäättelä, 2007). Bu bulgular ER-stesi ile uyarılan otofajinin ER genişlemesini telafi ettiği, biriken proteinleri ER'den uzaklaştırdığı ve bir hücre koruyucu fonksiyona sahip olduğunu göstermektedir.

Yakın zamanda tamamlanan bir çalışmada BTZ ve bir makrolid (azitromisin, klaritromisin veya eritromisin) kombinasyonunun CHOP'un transkripsiyonal aktivasyonu ile ER-stresi aracılı sitotoksiteyi arttırdığı belirlenmiştir. Transkripsiyonal olarak CHOP ile regüle edilen proapoptotik genlerin ekspresyon düzeylerinin de arttığı gösterilmiştir. BTZ ve klaritromisin kombinasyonunda hem agrezom oluşumu dramatik olarak artmış hem de ER-stresi ile ilişkili genlerin (CHOP, BAX, BIM, DR5, GADD34, TRB3) ekspresyonu artmıştır. Dolayısıyla ubikutin-proteozom sistemi (BTZ aracılığı ile) ve otofaji-lizozom sisteminin (makrolidler aracılığı ile) simultane inhibisyonu, MM hücrelerinde ER-stresi-aracılı apoptozu arttırmıştır (Moriya vd. 2013). BTZ'ye yanıtta otofajinin uyarılmasının moleküler mekanizması hala net değildir. Yapılan çalışmalar otofaji-lizozom sistemi ile ER-stresi arasındaki karşılıklı etkileşimin rol oynayabileceğini göstermektedir (Kawaguchi vd., 2011; Verfaillie vd., 2010). Moriya ve ark., her ne kadar makrolidlerin otofaji akışını bloke ettiklerini belirlemişlerse de, U266 hücrelerinde tek başına BTZ uygulaması ile karşılaştırıldığında, kombine kullanımlarında 48 saatten sonra otofaji uyarımının arttığını göstermişlerdir (Moriya vd. 2013). Son yıllarda yapılan bir çalışmada, intraselüler protein degradasyonunun ve agrezom oluşumunun eş zamanlı olarak inhibe edilmesinin, ER-stresi aracılı hücre ölümünü arttıracığı hipotezi öne sürülmüş ve sonuçta, SAHA, klaritromisin ve BTZ kombine tedavisinin meme kanseri hücre hatlarında apoptozu uyarıcı bir etkisinin olduğu ve kısmen bu artan etkinin ER-stres-aracılı CHOP uyarımı ile gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, refraktör-metastatik meme kanserli hastalar için agrezom oluşumu ve intraselüler proteolitik yolların birlikte hedeflendiği ER-stres yüklenme tedavisi ile ilgili yeni fikirler edinmemizi sağlamıştır (Komatsu vd., 2013).

GEREÇ ve YÖNTEM

Hücre Kültürü

Çalışmada değerlendirilen iki MM hücre hatlarına ait özellikler Tablo 1'de özetlendi. Ticari olarak temin edilen MM hücre hatları RPMI 8226 (ATCC) ve U266B1 (ATCC), 25 cm²'lik hücre kültürü kaplarında, %10 fetal sığır serumu (Sigma), %1 penisilin/streptomisin (Sigma) ve 0,3 g/L L-glutamin (Sigma) içerecek şekilde hazırlanan RPMI 1640 komple hücre kültürü ortamında, 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltıldı. Hücreler, kültür ortamında 1x10⁵ - 1x10⁶ hücre/mL olacak şekilde izlendi ve her 2-3 günde bir beslendi.

Tablo 1. MM hücre hatları ve özellikleri

U266B1	RPMI 8228
Bortezomibe-duyarlı	Bortezomibe-duyarlı
Dekzametazona-dirençli	Dekzametazona-dirençli
TP53'te A161T missens mutasyonu	TP53'te E285K missens mutasyonu
P16 full metilasyonu	P16 full metilasyonu

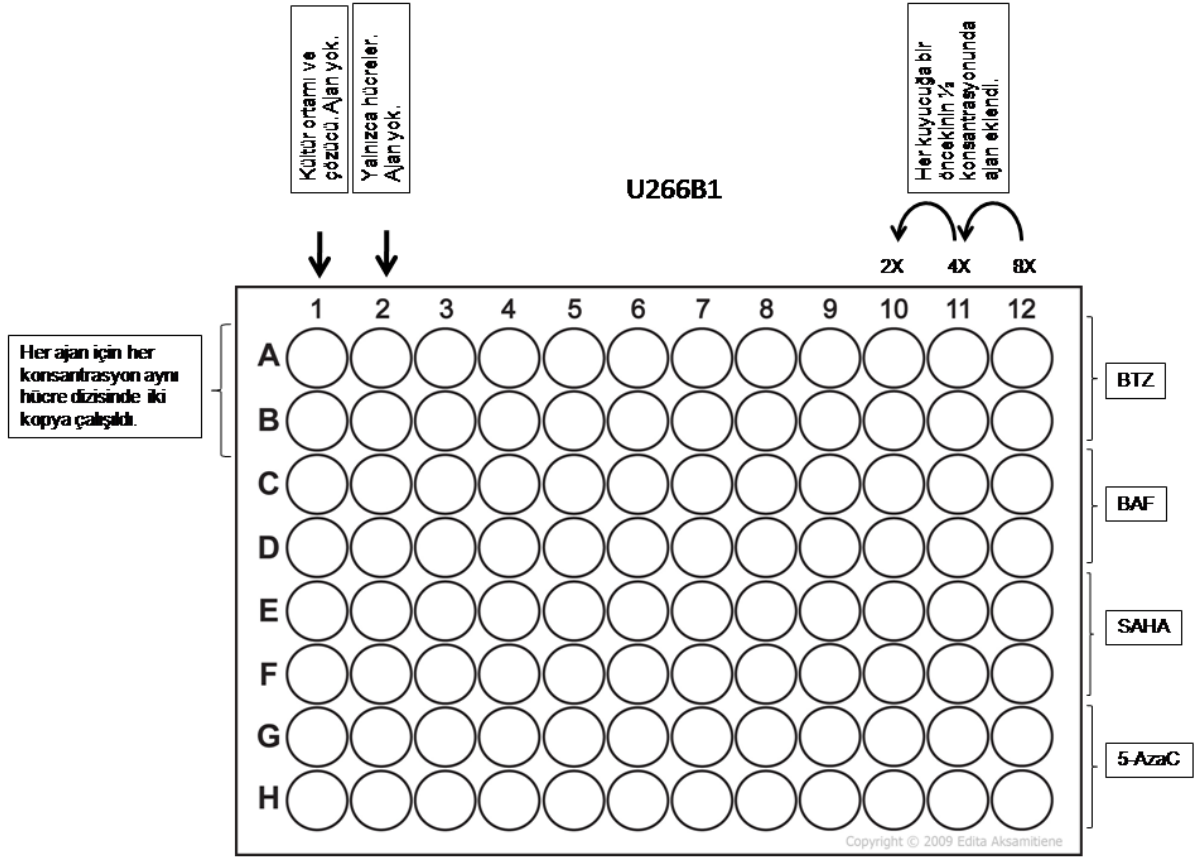
Sitotoksosite Testleri

Araştırmada kullanılan BTZ (Sigma), BAF (Sigma), SAHA (Sigma) ve 5-AzaC (Sigma) DMSO (Sigma) içerisinde çözüldü. Bu ajanların RPMI 8226 ve U266B1 hücreleri için tek tek ve kombine olarak IC₅₀ değerlerinin saptanması amacıyla ticari kit (Promega, CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay) kullanılarak MTT tabanlı sitotoksosite testi yapıldı. Bunun için aşağıdaki protokol izlendi:

- Hücreler 100 µL hücre kültürü ortamında 1x10⁵ hücre/mL sayıda hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültürü kabına alındı.
- Sitotoksik ajanlar her kuyucukta bir öncekinin yarı konsantrasyonunda olacak şekilde hücre kültürü ortamına eklendi. Her bir konsantrasyon için iki örnek çalışıldı. Deneyin bu basamağı Şekil 1'de sunulmuştur.
- 24 saat sonra boyama işlemine geçildi:
 - o Her kuyucuğa 15 µL boya solüsyonu eklendi
 - o Hücre kültürü kabı 37°C'de 1-4 saat inkübe edildi.
 - o Her bir kuyucuğa 100 µL Solübilizasyon/Stop solüsyonu eklendi.

- Boyama sonrası hücre kültürü kapları plate okuyucuda 570 nm dalga boyunda değerlendirildi.

Sitotoksik ajanların RPMI 8226 ve U266B1 hücreleri için IC₅₀ değerleri hesaplanırken öncelikle daha geniş konsantrasyon aralıkları çalışıldı. İzleyen deneylerle konsantrasyon aralığı daraltılarak en kesin IC₅₀ değerinin saptanması hedeflendi.



Şekil 1. Araştırmada uygulanan sitotoksikite testinin deney protokolü.

Annexin V (AV)/Propidium Iodide (PI) Boyaması

Projede kullanılan BTZ, BAF, SAHA ve 5-AzaC sitotoksik ajanları uygulanan RPMI 8226 ve U266B1 hücreleri, Annexin V (AV)/Propidium Iodide (PI) ile boyanarak flow sitometri analiziyle apoptotik açıdan değerlendirildi. Bunun için ticari olarak temin edilen 'BD Pharmingen FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I' kullanıldı ve üreticinin önerdiği aşağıdaki protokol uygulandı:

- Hücreler 24 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 1×10^7 hücre/mL olacak şekilde 500 μ L hücre kültürü ortamı içerisinde ekildi.
- Hesaplanan IC_{50} değerlerinde sitotoksik ajanlar hücre kültürüne eklendi ve hücreler 24 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda hücreler 2 kez soğuk PBS tamponuyla yıkandı.
- Yıkama sonrasında kit içerisinde yer alan bağlanma tamponu ile hücreler yeniden süspanse edildi.
- Hücre süspanسیونuna 5 μ L AV ve 5 μ L PI boya ları eklendi. Hafifçe vortekslendi.
- Oda sıcaklığında karanlık ortamda 15 dakika inkübasyon sonrasında hücreler flow sitometrik olarak analiz edildi.
- Hücreler AV+/PI- (erken apoptotik) veya AV+/PI+ (geç apoptotik) olduklarında apoptotik olarak değerlendirildi.

Western Blot Analizi

BTZ, BAF, SAHA ve 5-AzaC sitotoksik ajanları uygulanan RPMI 8226 ve U266B1 hücrelerinin endoplazmik retikulum (ER) stresi, apoptoz ve otofaji belirteçleri açısından western blot (WB) ile analizi de araştırma kapsamında gerçekleştirildi. Bu amaçla aşağıdaki protokol uygulandı:

- Hücreler 24 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 1×10^7 hücre/mL olacak şekilde 500 μ L hücre kültürü ortamı içerisinde ekildi.
- Hesaplanan IC_{50} değerlerinde sitotoksik ajanlar hücre kültürüne eklendi ve hücreler 24 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda hücreler 2 kez soğuk PBS tamponuyla yıkandı.
- Hücreler ticari olarak temin edilen hücre lizis tamponu kullanılarak (Cell Signalling Technology, 9803S) western blot analizi için hücre lizatları oluşturuldu:
- Hücre lizatlarının protein konsantrasyonları Bradford yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla ticari bir kit (DC Protein Assay, BioRad) ve ticari protein standardı (Protein Standard II, BSA, BioRad) kullanıldı. Uygulanan protokol aşağıda özetlendi:
 - Öncelikle protein standartları hazırlandı. Kısaca 1.29 mg/ml stok konsantrasyon 2 katlı dilüsyonlar yaparak toplamda 1.29-0.008 mg/ml konsantrasyonlarda 5 farklı standard hazırlandı.
 - Üretici firmanın belirttiği şekilde çalışma solüsyonu hazırlandı. Herbir standardın üzerine çalışma solüsyonu eklendi ve vorteksle iyice homojenize edildi.

- Bu karışımın üzerine kitle birlikte sağlanan bir diğer solusyonu eklendi ve 15 dk inkübasyondan sonra 595 nm'de (NanoDrop, Thermo Sci.) okuma yapıldı.
- Benzer şekilde protein örneklerine de standartlara uygulanan protokol uygulandı ve 595 nm'de okuma yapıldı. Örneklerdeki protein miktarları, standard grafiği baz alınarak hesaplandı.
- Hücre lizatları kuyu başına 30 µg protein olacak şekilde SDS-PAGE protein elektroforez jelinde yürütüldü ve PVDF membranlara transfer edilerek kaspaz aktivasyonunun belirteçleri olarak anti-kaspaz-3, anti-kaspaz-7; otofaji belirteçleri olan anti- LC3 ve anti-beklin 1 antikoru ile analiz edildi. Protein yükleme kontrolü olarak anti – β -aktin antikoru kullanıldı.

Akridin Oranj Boyaması

Hücrelerde otofajinin değerlendirilmesi amacıyla akridin oranj (Sigma) ile aşağıda sunulan yöntem kullanılarak supravital hücre boyaması yapıldı.

- Besiyeri uzaklaştırılarak hücre peleti PBS ile 2 kez yıkandı.
- 50 µl akridin oranj(1µg/ml) solüsyonu pelet üzerine ilave edildi.
- Örnek 37°C'de 15 inkübasyona bırakıldı
- İnkübasyonun ardından PBS ile 1 kez yıkama işlemi gerçekleştirildi
- Pelet 10 µl PBS'te sulandırılarak lam üzerine alındı
- Hücreler floresan mikroskopta (490-nm band-pass blue excitation filter ve 515-nm long-pass barrier filter ekipmanlı) analiz edilerek floresan görüntüleri alındı.

Kantitatif Real-Time PCR

Hücrelerde ER-stresini değerlendirmek amacıyla hücre pelletlerinden ticari kit (RNeasy® Mini Kit, Qiagen) yardımıyla total RNA izolasyonu yapıldı ve izole edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi yine ticari kit (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems) yardımıyla gerçekleştirilerek *CHOP* ve *XBP1* gen ekspresyonları kantitatif olarak gerçek-zamanlı PCR yöntemi kullanılarak belirlendi. Relatif kantitasyonda *β -aktin* geni referans gen olarak kullanıldı.

Hücrelerden total RNA izolasyonu aşağıdaki protokole göre yapıldı:

- Hücreler 24 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 1×10^7 hücre/mL olacak şekilde 500 µL hücre kültürü ortamı içerisinde ekildi.
- Hesaplanan IC_{50} değerlerinde sitotoksik ajanlar hücre kültürüne eklendi ve hücreler 24 saat inkübe edildi.

- İnkübasyon sonrasında hücreler 300 g'de 5 dakika santrifüj edilerek hücre kültürü ortamı uzaklaştırıldı.
- Hücre pelleti üzerine 350 µL kitin lizis tamponu eklendi ve vortekslendi.
- Hücre lizati üzerine 350 µL %70'lik etanol (Merck) ilave edildi ve mikropipet yardımı ile homojenize edildi.
- Hücre lizati kitle birlikte sağlanan 2 ml'lik toplama tüplerine yerleştirilmiş olan spin kolonlara aktarıldı ve 8.000 g'de 15 sn santrifüj edildi. Toplama tüpleri uzaklaştırıldı.
- Spin kolonlara kitle birlikte sağlanan Yıkama Tamponu 1'den 700 µl ilave edildi ve 8.000 g'de 15 sn santrifüj edildikten sonra toplama tüpü yeniden değiştirildi.
- Spin kolonlara kitle birlikte sağlanan Yıkama Tamponu 2'den 500 µl ilave edildi ve 8.000 g'de 15 sn santrifuj edildikten sonra toplama tüpü yeniden değiştirildi.
- Her bir spin kolon tekrar 8.000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Her bir spin kolon steril, RNaz-içermeyen 1.5 ml'lik tüplere yerleştirildi ve üzerlerine kitle birlikte sağlanan RNaz-içermeyen sudan 35 µl eklendi. 8.000 g'de 2 dk santrifuj edildi.
- Elde edilen total RNA örneklerinin cDNA sentezi öncesi konsantrasyonları ve saflıkları spektrofotometrik yöntemle (NanoDrop, Thermo Sci., USA) belirlendi. Örnekler, aynı gün aşağıda protokolü verilen ticari kit ile cDNA'ya dönüştürüldü.

İzole edilen total RNA örneklerinden cDNA sentezi, ticari kit (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems) yardımı ile yapıldı. cDNA sentezi için uygulanan protokolde temel basamaklar aşağıda sunulmaktadır:

- Her örnek için aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı:

Komponent	Miktar
Reverse transkriptaz (RT)	1 µl
RT tamponu	2 µl
RT primer karışımı	2 µl
dNTP karışımı	0.8 µl
RNase-free su	X µl (herbir örnek için ayrı hesaplandı)
Template RNA	X µl (20 µl'lik reaksiyon hacminde 2 µg total RNA olacak şekilde herbir örnek için ayrı hesaplandı)
Toplam hacim	20 µl

- Hazırlanan reaksiyon karışımı 42°C'de 15 dk inkübe edildi.
- Reverse transkriptazı inaktive etmek için, örnekler 95°C'de 3 dk inkübe edildi.

- Bu aşamaların sonunda 20 µl miktarında cDNA elde edildi.
- Örnekler, gerçek-zamanlı PCR ile analiz edilmek üzere -20°C'de saklandı.

CHOP ve *XBP1* genleri (hedef genler) ve *β-aktin* (referans gen) için relatif kantitasyon analizi, gerçek-zamanlı PCR sistemi (LightCycler 1.5 Instrument, Roche Diagnostics) kullanılarak yapıldı. Hedef genlerin ve referans genin mRNA düzeyinde ekspresyon analizi için kullanılan primer ve prob setlerine ait diziler Tablo 2'de verildi.

Tablo 2. *CHOP*, *XBP1* genleri ve *β-aktin* mRNA ekspresyon analizlerinde kullanılan özgün primer dizilimleri (5'→3')

<i>CHOP</i>	
Primer seti	GACCTGCAAGAGGTCCTGTC (Forward) CTCCTCCTCAGTCAGCCAAG (Reverse)
<i>XBP1</i>	
Primer seti	CTGCAGAGGTGCACGTAGTC (Forward) GCACCTGCTGCGGACTC (Reverse)
<i>β-aktin</i>	
Primer seti	AAA TCG TGC GTG ACA TTA A (Forward) CTC GTC ATA CTC CTG CTT G (Reverse)

CHOP, *XBP1* ve *β-aktin* genlerinin mRNA düzeyinde relatif ekspresyonlarını analiz etmek için Tablo 3 ve 4'de verilen gerçek-zamanlı PCR karışımı ve protokolü uygulandı. Her bir örnek için gerçek-zamanlı PCR analizleri 2 farklı reaksiyonda 3 kez tekrar edildi ve floresan değeri olarak 3 analizin ortalaması alındı.

Tablo 3. *CHOP*, *XBP1* ve *β-aktin* genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyonlarını belirlemek amacı ile hazırlanan reaksiyon karışımı

Komponent	Miktar
Master karışımı (2X)	10 µL
Primer-Probe karışımı	1 µl
PCR-grade su	6 µl
cDNA örneği	3 µl

Tablo 4. *CHOP*, *XBP1* ve *β -aktin* genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyonlarını belirlemek amacı ile uygulanan gerçek-zamanlı PCR protokolü*

Analiz Modu	Döngü	Segment	Isı	Süre	Kazanım Modu
Pre-inkübasyon	1		95°C	10 dk	-
Amplifikasyon	60	Denatürasyon	95°C	15 sn	-
		Annealing	60°C	30 sn	-
		Ekstensiyon	72°C	15 sn	Tek okuma
Soğutma	1		40°C	30 sn	

*: Gerçek-zamanlı PCR Protokolü; Pre-inkübasyon: Enzim aktivasyonu ve kalıp cDNA'nın denatürasyonu, Amplifikasyon: Hedef bölgenin primerler yardımı ile çoğaltılması ve özgün proplar yardımı ile ürünün belirlenmesi, Soğutma: Sistemde yer alan rotorun soğutulması basamaklarını içermektedir.

Optimize edilen protokollerle örneklerin gerçek-zamanlı PCR aşamaları tamamlandı ve "relatif kantitasyon" olarak örneklerin ekspresyon düzeyleri belirlendi. Bu amaçla, her bir örneğin hedef gene ait mRNA ekspresyon düzeyi, aynı örneğin referans gen olan *β -aktin* (aynı zamanda, relatif kantitasyonda eksternal standard) ekspresyon düzeyi gerçek-zamanlı PCR sisteminde varolan yazılım programı (LightCycler Relatif Kantitasyon Yazılım Programı) kullanılarak hesaplandı ve relatif olarak kantite edildi. Eksternal standart, gerçek-zamanlı PCR ile kantitasyon sırasında hedef ve referans cDNA miktarları arasındaki farklılığı, örnek yüklemedeki varyasyonları ve PCR inhibitörlerinin etkisini dengelemede yardımcı olması amacı ile seçildi.

BULGULAR

1. IC₅₀ değerleri

U266B1 ve RPMI 8226 MM hücre dizilerinde BTZ, BAF, SAHA ve 5-AzaC ajanlarının tek tek ve dörütlü kombinasyon IC₅₀ değerleri Tablo 5' de verilmiştir:

Tablo 5. Projede kullanılan ajanların IC₅₀ değerleri

	IC ₅₀ RPMI 8226 (µM)	IC ₅₀ U266B1 (µM)
BTZ	0,04	5
5-AZA	9	20
SAHA	40	2,56
BAF	0,03	0,008
BAF+BTZ+ 5-AZA+SAHA	0,00625 _{BAF} /0,125 _{BTZ} /1,25 _{5-AZA} /5 _{SAHA}	0,0005 _{BAF} /0,3125 _{BTZ} /0,625 _{5-AZA} /0,16 _{SAHA}

2. BTZ, BAF, SAHA ve 5-AzaC kombinasyon tedavisi MM hücre hatlarında apoptozu uyarır

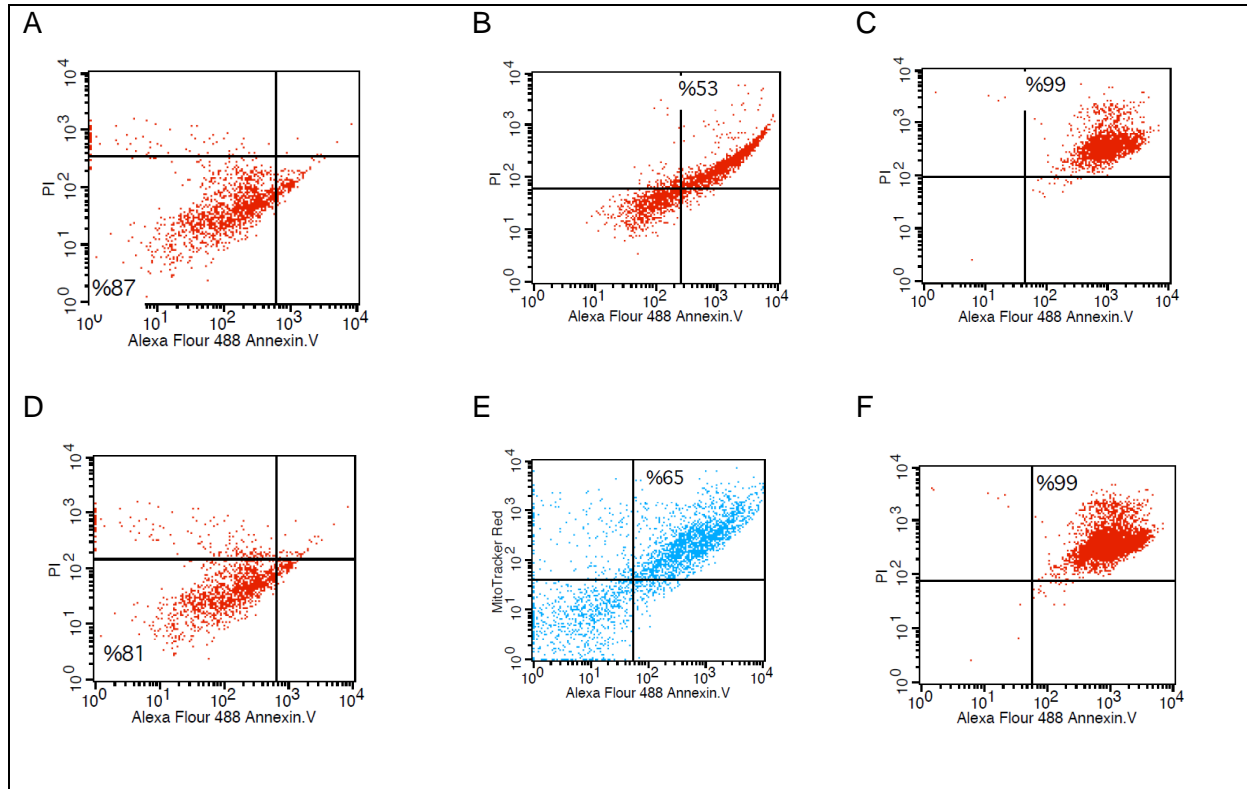
Dörütlü kombinasyon tedavisinin zamana bağlı olarak hücrelerde sitotoksik etki gösterdiği belirlendi. 24 saat inkübasyon sonrası, test edilen tüm hücre hatlarında sitotoksik etki gösterdiği ve 48 saat sonra tüm hücrelerin öldüğü belirlendi.

Annexin V-flow sitometri sonuçları Tablo 6'da gösterilmiştir. Buna göre herbir ajanın tek başına MM hücre hatlarında erken apoptotik hücre ölümüne neden olduğu, 4'lü kombinasyonun ise geç apoptotik/nektorik hücre ölümüne neden olduğu belirlendi. RPMI 8226 hücrelerinde, BTZ uygulaması sonrası geç apoptotik hücre oranı %53 iken 4'lü kombine tedavide bu oran %99 olarak belirlendi. Benzer şekilde, U266B1 hücrelerinde BTZ uygulaması sonrası geç apoptotik hücre oranı %65 iken 4'lü kombine tedavide bu oran %99 olarak belirlendi. Şekil 2'de örnek flow sitometri sonuçları verilmiştir.

Tablo 6. Annexin V-flow sitometri sonuçları

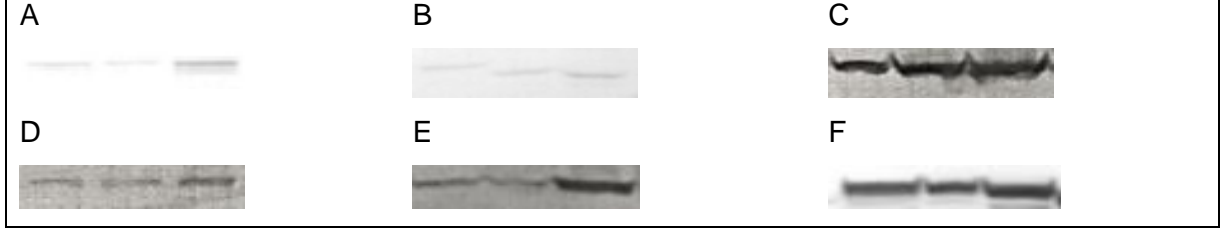
	U266B1		RPMI 8226	
	PI	AV	PI	AV
5-azasitidin	10.82	79.38	10.08	74.25
Bafilomisin	16.90	79.49	64.92	76.59
Bortezomib	19.07	84.53	23.89	80.21
SAHA	9.61	69.60	8.76	75.95
Kombine	99.50	99.69	99.44	99.72

PI: Propidium iodide, AV: Anneksin V, degerler % olarak verilmektedir.



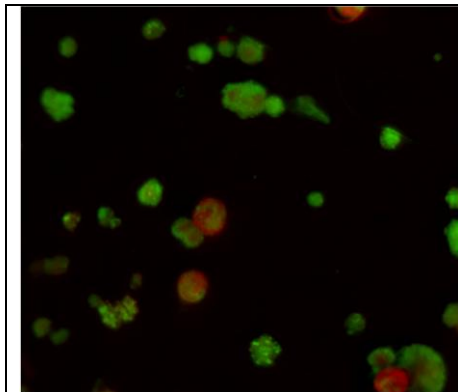
Şekil 2. MM hücre hatlarında sitotoksik ajan uygulaması sonrası Annexin V- flow sitometri görüntüleri. (A) Ajan uygulaması yapılmamış RPMI 8226 hücreleri, (B) BTZ uygulaması sonrası RPMI8226 hücreleri, (C) 4'lü kombine uygulama sonrası RPMI 8226 hücreleri, (D) Ajan uygulaması yapılmamış U266B1 hücreleri, (E) BTZ uygulaması sonrası U266B1 hücreleri, (F) 4'lü kombine uygulama sonrası U266B1 hücreleri.

Apoptozun değerlendirilmesinde kaspaz aktivasyonu belirteçleri olan kaspaz-3 ve kaspaz-7 proteinlerinin Western blot analizlerinde ise, her iki hücre dizisinde de bu proteinlerin ekspresyonlarında artış gözlenmedi (Şekil 3). Flow sitometri sonuçlarından sonra, beklendiği gibi Western blot sonuçlarında iki kaspaz proteininin ekspresyonunda değişikliğin gözlenmemesi geç apoptotik/sekonder nekrotik sürecin göstergesi olarak değerlendirildi.

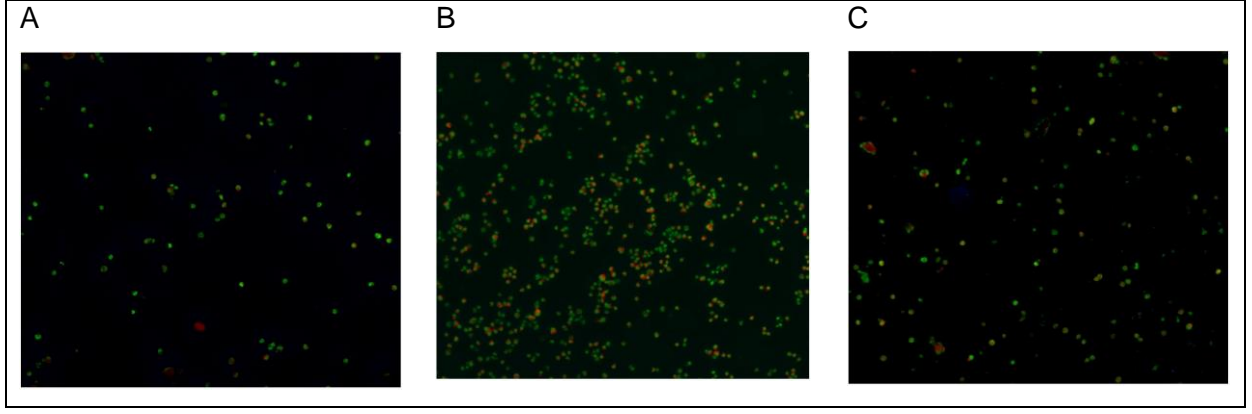


Şekil 3. MM hücre hatlarında sitotoksik ajan uygulaması sonrası kaspaz-3 (A ve D) ve kaspaz-7 (B ve E) western blotlama görüntüleri. Üst sırada RPMI 8226 hücreleri, alt sırada U266B1 hücrelerine ait sonuçlar gösterilmektedir, her panelde ilk kuyucuk dörtlü kombine, ikinci kuyucuk BTZ ve son kuyucuk ajan uygulanmamış hücelere aittir. C ve F panelleri β -aktin protein yükleme kontrolüdür.

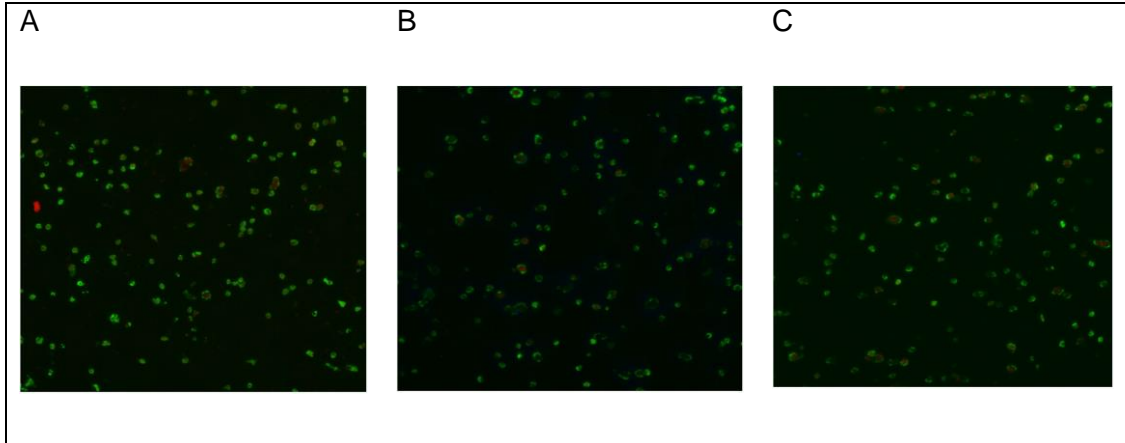
Kombine tedavinin otofaji ile ilişkili olup olmadığının belirlenmesi amacı ile de akridin oranj boyaması yapıldı ve asidik veziküller görüntülendi. Beklendiği gibi BAF uygulamasının lizozomla otofagozomların füzyonunu (asidik veziküller) bloke ettiği gözlemlendi ve bu durumda MM hücrelerinde %2-3 akridin oranj pozitifliği gözlemlendi (Şekil 4). Dörtlü kombinasyon tedavisinde de sırasıyla RPMI 8226 ve U266B1 hücrelerinde akridin oranj pozitif hücre varlığı %14 ve %16 olarak belirlendi (Şekil 5 ve 6). Akridin oranj boyama sonuçları kombine tedavi sonrası otofajinin uyarılmadığını göstermektedir. Bu bulgunun teyidi amacı ile, 4'lü kombine tedavi uygulaması yapılan MM hücre hatlarında otofaji belirteçleri olarak Beclin-1 ve LC3 ekspresyonları WB analizi ile değerlendirildi ve bu proteinlerin ekspresyonlarında artış gözlenmedi (Şekil 7).



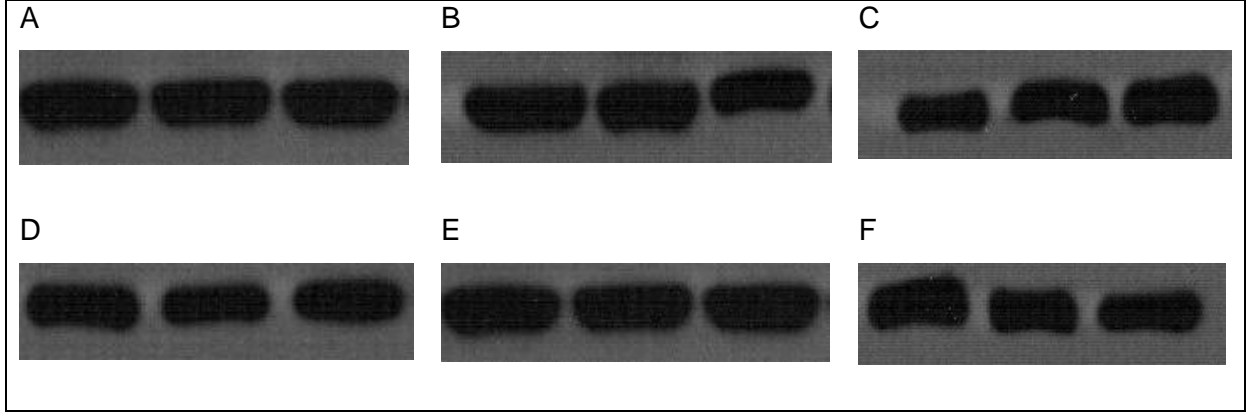
Şekil 4. Bafilomisin uygulanan RPMI 8226 hücrelerinde fluoresan mikroskopta akridin oranj boyaması ile asidik veziküllerin görünümü (x400). Canlı hücreler yeşil renkte gözlenirken, kırmızı renk asidik veziküllerin varlığını göstermektedir.



Şekil 5. Akridin oranjlı boyanan U266B1 hücreleri. Hücreler floresan mikroskop altında görüntüledi (x100) Canlı hücreler yeşil renkte gözlenirken, kırmızı renk asidik veziküllerin varlığını göstermektedir. (A) Tedavi uygulanmamış hücre, (B) BTZ uygulanmış hücre, (C) Kombine tedavi uygulanmış hücre



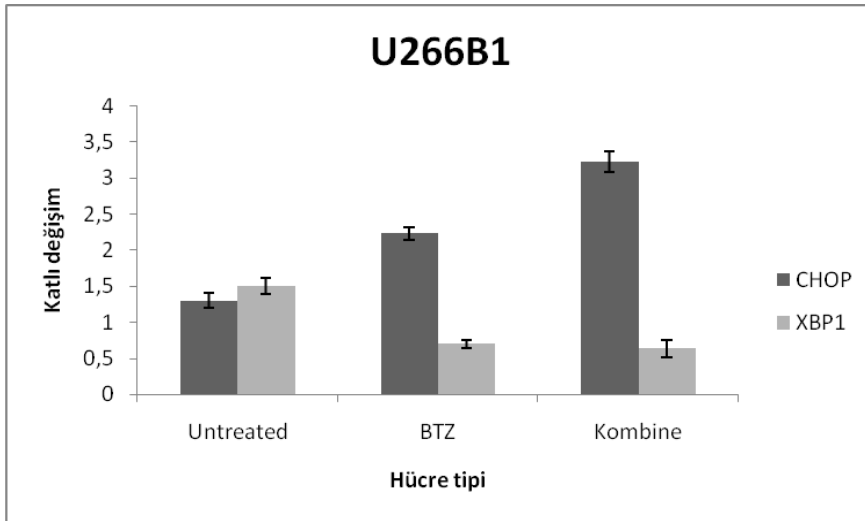
Şekil 6. Akridin oranjlı boyanan RPMI 8226 hücreleri. Hücreler floresan mikroskop altında görüntüledi (x100) Canlı hücreler yeşil renkte gözlenirken, kırmızı renk asidik veziküllerin varlığını göstermektedir. (A) Tedavi uygulanmamış hücre, (B) BTZ uygulanmış hücre, (C) Kombine tedavi uygulanmış hücre



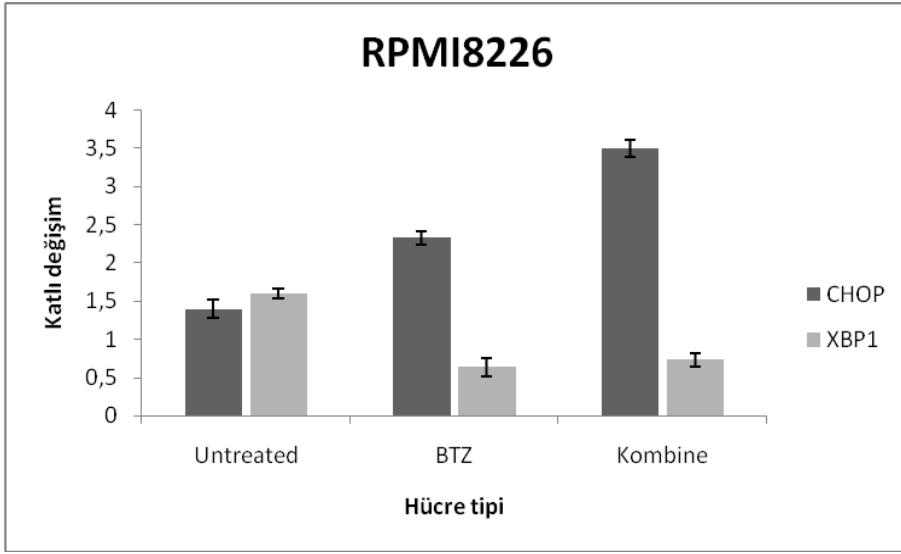
Şekil 7. MM hücre hatlarında sitotoksik ajan uygulaması sonrası Beclin-1 (A ve D) ve LC3 (B ve E) western blotlama görüntüleri. Üst sırada RPMI8226 hücreleri, alt sırada U266B1 hücrelerine ait sonuçlar gösterilmektedir, her panelde ilk kuyucuk dörtlü kombine, ikinci kuyucuk BTZ ve son kuyucuk ajan uygulanmamış hücelere aittir. C ve F panelleri β -aktin protein yükleme kontrolüdür.

3. Kombine tedavi hücreleri ER-stresi aracılı apoptoza götürür

Dörtlü kombine tedavinin ER stresindeki artışla mı hücreyi apoptoza yönlendirdiğini belirlemek amacı ile ER-stresi ile ilişkili genlerden *CHOP* ve *XBP1* ekspresyon analizi yapıldı. Her iki MM hücre hattında da BTZ ve 4'lü kombine tedavi sonrasında *XBP1* mRNA düzeyinde artış gözlenmezken, *CHOP* mRNA düzeyinde artış gözlemlendi (Şekil 8 ve 9). Ajan uygulaması yapılmamış her iki hücre hattında da, beklendiği üzere (Myeloma hücrelerinde aşırı miktarda Ig birikimi nedeniyle *XBP1* ekspresyonu bazal olarak yüksektir), *XBP1* ekspresyonu ajan uygulaması yapılan hücelere göre daha daha yüksekti.



Şekil 8. U266B1 MM hücre hattında *CHOP* ve *XBP1* gen ekspresyonları.



Şekil 9. RPMI 8226 MM hücre hattında *CHOP* ve *XBP1* gen ekspresyonları

TARTIŞMA VE SONUÇ

MM'da tedavi seçenekleri oldukça hızlı ilerlemekte ve değişmektedir. Kronolojik olarak melfalan ve siklofosfamid gibi alkilleyicilerle başlayan tedavi seçenekleri, prednizon ve dekzametazon gibi kortikosteroidler, doksorubisin gibi antrasiklinlerle devam etmiş ve günümüzde yerini bortezomib gibi proteozom inhibitörleri ile talidomid ve leanlidomid gibi immunmodulator ilaçlara bırakmıştır. Yeni ilaçların kullanımı ile tedavi stratejilerindeki bu değişimler, tedaviden alınacak yanıtın kalitesini arttırmasına karşın, MM'da henüz arzu edilen düzeyde yanıtın alındığı ve üzerinde konsensus sağlanmış bir tedavi stratejisi bulunmamaktadır (Moreau vd., 2015). Çalışmamızda BTZ-tabanlı BAF, SAHA ve 5-AzaC'den oluşan kombine tedavinin MM hücreleri üzerindeki etkinliğinin değerlendirilmesi hedeflendi.

Proteozom inhibitörü olan BTZ'nin, myeloma hücrelerinde otofajiyi uyardığı gösterilmiştir (Hoang vd., 2009). Otofaji inhibitörü olan BAF-aracılı otofaji inhibisyonunun, MM hücre hatlarında ER stresini arttırarak BTZ-aracılı apoptozu arttırdığı rapor edilmiştir (Kawaguchi vd., 2011). BTZ-aracılı ubikutin proteozom inhibisyonu ve bir makrolid aracılı otofaji-lizozom sisteminin inhibisyonunun birlikteliğinin, myeloma hücrelerinde ER-stresi-aracılı hücre ölümünü uyardığı ve intraseluler ubikutinle-konjuge proteinlerin birikimine neden olduğu gösterilmiştir (Moriya vd., 2013). Biz de çalışmamızda, beklediğimiz gibi BTZ, BAF, SAHA ve 5-AzaC kombinasyonunun MM hücre hatlarında belirgin bir biçimde hücre çoğalmasını inhibe ettiğini belirledik. Artan sitotoksitenin apoptozla ilişkili olup olmadığını belirlemek için de bir sonraki aşamada flow sitometri analizlerini tamamladık. Her bir ajanın tek başına kullanımı ile karşılaştırıldığında MM hücre hatlarında 4'lü kombine tedavinin, hem anneksin-V pozitif hem de propidium iodide pozitif myeloma hücre popülasyonunu arttırdığını bulduk. Bu bulgular MM hücrelerinin geç apoptotik veya sekonder nekrotik hücreler olduklarını göstermektedir. Erken veya geç apoptotik hücre olumunu teyit etmek amacı ile de, kaspaz 3 ve kaspaz 7 ekspresyonunu WB analizi ile değerlendirdik ve 4'lü kombinasyonda her iki kaspazın ekspresyonunun artmadığını belirledik. Kaspaz 3 ve 7 ekspresyonu özellikle erken apoptotik süreçte gözlenen bir değişimdir (McIlwain vd., 2013) ve bulgularımız 4'lü kombinasyonla hücre olumunun büyük olasılıkla geç apoptotik/sekonder nekrotik süreçle ilişkili olduğunu göstermektedir.

Geç apoptotik ve nekrotik süreçte ortak nokta plazma membranının hasara uğramasıdır. Geç apoptotik hücreler, ortadan kaldırılmamış erken apoptotik hücrelerden köken aldığı için, erken apoptotik hücrelerin ortadan kaldırılmasında yer alan moleküler mekanizmaların çoğu geç apoptotik hücrelerin ve hatta nekrotik hücrelerin fagositozunda da yer alırlar. Örneğin

erken apoptotik hücre yüzeyinde “beni ye” sinyali olan fosfatidilserin (PS) geç apoptotik ve nekrotik hücrelerin makrofajlar tarafından tanınmasında ve fagositozunda yer alır (Nagata vd., 2016; Krysko ve Vandenabeele, 2008) Erken apoptotik süreç sıklıkla anti-inflamatuvar bir yanıt olarak değerlendirilmesine karşın, geç apoptotik ve sekonder nekrotik süreç sıklıkla inflamasyonla ilişkilidir ve immunitiyi uyarır. Ancak, erken apoptotik hücrelerin ve geç apoptotik/sekonder nekrotik hücrelerin uzaklaştırılması ile ilgili immunolojik sonuçları belirleyen faktörler oldukça kompleksdir ve çoğu zaman bu konuda fikir birliğine varılamamıştır. Ölen hücrelerin uzaklaştırılması ile ilişkili immunolojik yanıtlar ölen hücrelerin tipi, hücre ölümünün evresi, fagositik hücreler tarafından tanınma ve fagositoz süreçleri, hücre ölümünün gerçekleştiği mikroçevredeki fagositlerin tipi gibi birçok faktörden etkilenmektedir (Krysko ve Vandenabeele 2008; Lockshin, 2016). Bu kompleks süreç nedeniyle de, literatürlerde farklı sonuçlar yer almaktadır. Her ne kadar ölen hücrenin orijini önemli olsa da, ölen hücreler tarafından açığa çıkan immunomodulator sinyaller ve aktive olan fagositik hücreler tarafından salınan sinyaller, hücre ölümünü takiben hücrelerin uzaklaştırılması sürecinin kalitesini belirlemede önemli faktörlerdendir. Ölen hücrelerdeki membran bütünlüğü, hücre ölümünün farklı evrelerini (örneğin erken apoptotik veya geç apoptotik hücreler) ayırmada önemli kriterlerden biridir. Fonksiyonel olarak, geç apoptotik ve nekrotik hücrelerde membran bütünlüğünün kaybı, pro-inflamatuvar yanıtı uyaracak endojen tehlike sinyallerinin salınımında kritik rol oynamaktadır (Kono ve Rock, 2008). Isı şok proteinleri, DNA gibi geç apoptotik/nekrotik hücrelerden köken alan tehlike sinyalleri Toll-benzeri reseptör (TLR) ailesi üyeleri tarafından tanınırlar (Garg vd., 2014). Projemiz sonucunda elde ettiğimiz veriler çevresinde, bir sonraki hedefimiz MM’da bu 4’lü tedavi kombinasyonunun immunolojik yanıtlarına odaklanmak olacaktır.

Sentezledikleri Ig moleküllerinin bilinmesi ve bu moleküllerin otofaji inhibisyonuna duyarlı olmaları nedeniyle çalışmamızda U266B1 ve RPMI 8226 hücre hatlarını kullandık. Myeloma hücrelerinde aşırı miktarda protein birikimi nedeniyle, bazal otofaji düzeyi yüksektir. Hoang ve ark., ajan uygulaması yapılmamış U266B1 ve RPMI 8226 hücre hatlarında otofaji belirteci olan LC3 ekspresyonunun yüksek olduğunu (sırası ile %65 ve %85) olduğunu belirlemişlerdir. (Hoang vd., 2009). Çalışmamızda ajan uygulaması yapılmamış her iki hücre hattında da akridin oranj pozitifliği yüksek bulundu. Bu bulguların, literatürle uyumlu olduğu gözlemlendi.

Daha önce bahsedildiği üzere, MM hücrelerinde BTZ ve bafilomisin sinerjik etki göstermektedirler (Kawaguchi vd., 2011). Bazı histon deasetilazlar (HDAC)’ların proteazom inhibitör direncinde yer aldıkları gösterilmiştir. Bu veriler, proteazom inhibitörlerinin HDAC inhibitörleri ile kombine kullanımlarında proteazom inhibitör direncinin üstesinden

gelinebileceğini düşündürmüştür. Multipl myelomda HDAC1 knock-down edildiğinde BTZ- aracılı apoptosis artarken, HDAC1 aşırı ekspresyonunun bortezomib direncine neden olduğu gösterilmiştir (Kikuchi vd., 2010). BTZ ile SAHA kombinasyonunun değerlendirildiği bir faz III klinik çalışmasında, MM hastalarında, plasebo grubu ile karşılaştırıldığında SAHA-BTZ kombinasyonu ile tedavi edilen grupta overall yanıt oranı %54 olarak rapor edilmiştir (Dimopoulos vd., 2013). Biz de çalışmamızda bir HDAC inhibitörü olan SAHA'nın da yer aldığı BTZ-tabanlı kombine tedavinin sinerjik etki göstererek MM hücre ölümünde etkin olduklarını belirledik.

5-azasitidin, sitozin analogudur ve hücrel DNA ve/veya RNA ile etkileşime girer. Yapısında C6 ile DNA metiltransferaz (DNMT)'ların sistein tiolati arasında kovalent bağ oluşur ve DNMT'ler bloke olur. Bir başka ifade ile 5-azasitidin bir DNMT inhibitörüdür. Kansere ilişkili fonksiyonları açısından sonuçta hücrel DNA demetile olur ve bazı inaktif genlerin reaktivasyonu gerçekleşir ya da birbirine kovalent bağlı irreversible enzim-DNA yapısı DNA hasarını uyarır (Bhalla, 2005). Son yıllarda hematolojik malignansiler de dahil farklı kanser türlerinin tedavisinde 5-azasitidini içeren epigenetik tedavilerin de değerlendirildiği birçok çalışma bulunmaktadır (Wongtrakoongate, 2015). 5-azasitidin myeloma hücrelerindeki etkinliği ile ilgili çalışmalar ise oldukça sınırlıdır. Kiziltepe ve ark. MM hücre hatlarında gerçekleştirdikleri çalışmalarında, ilk kez 5-azasitidin DNA çift iplik kırık yanıtını uyararak MM hücrelerinde apoptozu uyardıklarını belirlemişlerdir. Aynı zamanda araştırmacılar, bortezomib tedavisi alan MM hücrelerinin 5-AzaC ile uyarılan sitotoksiteyi arttırdıklarını ve sinerjik etki gösterdiklerini belirlemişlerdir (Kiziltepe vd., 2007). Biz de çalışmamızda bir DNMT inhibitörü olan 5-AzaC'nın da yer aldığı BTZ-tabanlı kombine tedavinin sinerjik etki göstererek MM hücre ölümünde etkin olduklarını belirledik.

Bilgilerimiz dahilinde MM'da bu 4'lü kombinasyonun değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda da 4'lü kombinasyon tedavisinin ajanların tek başına neden oldukları sitotoksik etkiden daha güçlü sitotoksik etkiye neden oldukları belirlenmiştir. Bir başka ifade ile bu 4 ajan sinerjik etki göstererek MM hücrelerinde ölüme neden olmaktadır. Dörtlü kombine tedavinin ER stresindeki artışla hücreyi apoptoza yönlendirdiğini araştırmak amacı ile ER-stresi ile ilişkili genlerden CHOP ve XBP1 ekspresyon analizini yaptık ve CHOP geninde 4'lü kombine tedavi grubunda her iki hücre hattında da ekspresyon artışı gözlemledik. CHOP (GADD153) proteini oldukça potent pro-apoptotik bir faktördür. Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR) sinyal iletim yolu ve diğer sinyal iletim yolları ile aktive olur. UPR, ER-stres yanıtında yer alan önemli bir sinyal iletim yoludur. Hücrel hemostazın korunmasında, fazla miktarda biriken veya yanlış katlanan proteinlerin uzaklaştırılması veya tekrar kullanılabilir hale getirilmesi son derece önemlidir (Aronson ve Davies, 2012) Ubikutin-

proteazom sistemi ve otofaji-lizozom sistemi, iki major intraselüler protein degradasyon sistemidir. Multipl myelomda plazma hücreleri fazla miktarda immunoglobulin üretirler ve katlanmamış immunoglobulinlerin aşırı miktarda olması, ER stresinde artışa neden olur. Bu proteinler ya proteazom aracılığı ile (Davenport vd., 2007) ya da otofaji aracılığı ile (Hoang vd.,2009) uzaklaştırılırlar. Bu veriler, bu iki major degradasyon sisteminin terapötik hedef olmalarına neden olmuştur. Otofaji, normal hücrelerde hemostazın devamlılığında önemli bir koruyucu rol üstlenmektedir. Myeloma hücrelerinde aşırı miktarda protein birikimi nedeniyle, bazal otofaji düzeyi yüksektir (Hoang vd.,2009). Biz de çalışmamızda değerlendirdiğimiz 4'lü kombine tedavi ile bu iki major protein degradasyon sistemini de kullanan ajanları MM hücre hatlarına uyguladık. Sonuçta, bu degradasyon sistemlerinin eş zamanlı uyarımının, MM hücrelerinde CHOP aracılı ER-stresini artırarak apoptotik süreçlerin aktivasyonuna neden olduğunu düşünüyoruz.

Sonuç olarak,

- BTZ, BAF, SAHA ve 5-AzaC'dan oluşan dörtlü kombinasyon tedavisi, proje kapsamında araştırıldığı üzere, protein degradasyon sistemlerinin eş zamanlı baskılanmasına (Bortezomib aracılı ubiquitin proteazom sisteminin baskılanması ve bafilomisin aracılı otofajinin baskılanması) yol açarak MM hücrelerinde ER stresini artırmaktadır. Bu da CHOP gibi ER-stresi aracılı apoptotik sinyallerin aktivasyonuna neden olarak, MM hücrelerinde apoptoza neden olarak MM'da güçlü bir biçimde apoptozu uyarır.
- Gelecekte, dörtlü kombine tedavi uygulamasının MM hücre ölümünde apoptozun mekanizması ile ilgili olarak TUNEL, kromozomal DNA elektroforezi gibi farklı moleküler yöntemlerle apoptotik sürecin daha ayrıntılı incelenmesi planlanabilir. Ayrıca, MM'da bu 4'lü tedavi kombinasyonunun immunolojik yanıtları da kapsayan yeni projelerin yapılması hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR

- Adams, H., Fritzsche, F. R., Dirnhofer, S., Kristiansen, G., Tzankov, A. 2010. 'Class I histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in classical Hodgkin's lymphoma' *Expert Opin Ther Targets*, 14(6),577–84.
- American Cancer Society. Retrieved April 30, 2010, from American Cancer Society: <http://www.cancer.org/>, 2011.
- Anderson, K. C. 2011. 'New insights into therapeutic targets in myeloma.' *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011, 184-190.
- Aronson, L. I., Davies, F. E. 2012. 'DangER: protein ovERload. Targeting protein degradation to treat myeloma', *Haematologica*, 97, 1119–1130.
- Badros, A., Burger, A.M., Philip, S., Niesvizky, R., Kolla, S. S., et al. 2009. 'Phase I study of vorinostat in combination with bortezomib for relapsed and refractory multiple myeloma', *Clin Cancer Res*, 15, 5250–5257.
- Berenson, J. R., Ma, H. M., Vescio, R., 2001. 'The role of nuclear factor kappa B in the biology and treatment of multiple myeloma.' *Semin Oncol*, 28, 626-633,
- Bhalla, K. N. 2005. 'Epigenetic and chromatin modifiers as targeted therapy of hematologic malignancies' *J Clin Oncol*, 23,3971–93.
- Bird, J. M., Owen R.G, D'Sa S, et al. 2011. 'Guidelines for the diagnosis and management of multiple myeloma' *Br J Haematol*, 154, 32-75.
- Bolden, J. E., Peart, M. J., Johnstone, R. W. 2006. 'Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors' *Nat Rev Drug Discov*, 5(9),769–84.
- Carew, J. S., Giles, F. J., Nawrocki, S. T. 2008. 'Histone deacetylase inhibitors: mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy', *Cancer Lett*, 269, 7–17.
- Christman, J. K. 2002. '5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy', *Oncogene* 21,5483–5495.
- Davenport, E. L., Moore, H. E., Dunlop, A. S., Sharp, S.Y., Workman, P., Morgan, G. J. et al. 2007. 'Heat shock protein inhibition is associated with activation of the unfolded protein response pathway in myeloma plasma cells', *Blood*, 110, 2641–2649.
- Demchenko, Y. N., Kuehl, W.M. 2010. 'A critical role for the NFκB pathway in multiple myeloma', *OncoTarget*, 59.
- Dimopoulos, M., Siegel, D. S., Lonial, S., Qi, J., Hajek, R., Facon, T., Rosinol, L., Williams, C., Blacklock, H., Goldschmidt, H., Hungria, V., Spencer, A., Palumbo, A., Graef, T., Eid, J. E., Houp, J., Sun, L., Vuocolo, S., Anderson, K. C. 2013. 'Vorinostat or placebo in combination with bortezomib in patients with multiple myeloma (VANTAGE 088): a multicentre, randomised, double-blind study', *Lancet Oncol*, 14, 1129-40.

Dokmanovic, M., Clarke, C., Marks, P.A. 2007. 'Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives' *Mol Cancer Res*, 5(10),981–9.

Fandy, T. E., Shankar, S., Ross, D. D., Sausville, E., Srivastava, R. K. 2005. 'Interactive effects of HDAC inhibitors and TRAIL on apoptosis are associated with changes in mitochondrial functions and expressions of cell cycle regulatory genes in multiple myeloma' *Neoplasia*, 7(7),646–657.

Fels, D. R., Ye, J., Segan, A.T., et al. 2008. 'Preferential cytotoxicity of bortezomib toward hypoxic tumor cells via overactivation of endoplasmic reticulum stress pathways', *Cancer Res*, 68, 9323-9330.

Frew, A. J, Johnstone, R. W., Bolden, J. E. 2009. 'Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors' *Cancer Lett*, 280(2),125–33.

Garg, A. D., Martin, S., Golab, J. and Agostinis, P. 2014. 'Danger signalling during cancer cell death: origins, plasticity and regulation', *Cell Death and Differentiation*, 21, 26–38.

Glozak, M. A., Seto, E. 2007. 'Histone deacetylases and cancer', *Oncogene*, 26(37),5420–32.

Herr, I., Debatin, K. M. 2001. 'Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy', *Blood*, 98, 2603-2614.

Hideshima, T., Chauhan, D., Richardson, P., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Hayashi, T., Munshi, N., Dang, L., Castro, A., Palombella, V., Adams, J., Anderson, K.C. 2002. 'NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma.' *J Biol Chem*, 277,16639-16647.

Hoang, B., Benavides, A., Shi, Y., Frost, P., Lichtenstein, A. 2009. 'Effect of autophagy on multiple myeloma cell viability', *Mol Cancer Ther*, 8, 1974–1984.

Høyer-Hansen, M. And Jäätelä, M. 2007. 'Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium', *Cell Death Differ*, 14, 1576-1582.

Jazirehi, A. R. 2011. 'Regulation of apoptosis-associated genes by histone deacetylase inhibitors: implications in cancer therapy', *Anticancer Drugs*, 21(9), 805–13.

Kane, R. C, Farrell, A. T, Sridhara, R., Pazdur, R. 2006. 'United States Food and Drug Administration approval summary: bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy.' *Clin Cancer Res*, 12, 2955–2960,

Kawaguchi, T., Miyazawa, K., Moriya, S., et al. 2011. 'Combined treatment with bortezomib plus bafilomycin A1 enhances the cytotoxic effect and induces endoplasmic reticulum stress in U266 myeloma cells: cross talk among proteasome, autophagy-lysosome and ER stress.' *Int J Oncol*, 38, 643-654.

Kelly, W. K., O'Connor O. A., Krug, L. M., et al. 2005. 'Phase I study of an oral histone deacetylase inhibitor, suberoyl anilidehydroxamic acid, in patients with advanced cancer', *J Clin Oncol*, 23, 3923–31.

Kikuchi, J., Wada, T., Shimizu, R., Izumi, T., Akutsu, M., Mitsunaga, K., Noborio-Hatano, K., Nobuyoshi, M., Ozawa, K., Kano, Y., Furukawa, Y. 2010. 'Histone deacetylases are critical targets of bortezomib-induced cytotoxicity in multiple myeloma', *Blood*, 116, 406-417.

Kiziltepe, T., Hideshima, T., Catley, L., Raje, N., Yasui, H., Shiraishi, N., Okawa, Y., Ikeda, H., Vallet, S., Pozzi, S., Ishitsuka, K., Ocio, E. M., Chauhan, D., Anderson, K. C. 2007. '5-Azacytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, induces ATR-mediated DNA double-strand break responses, apoptosis, and synergistic cytotoxicity with doxorubicin and bortezomib against multiple myeloma cells', *Mol Cancer Ther*, 6(6),1718-1727.

Klionsky, D. J., Elazar, Z., Seglen, P. O., 2008. 'Rubinsztein DC. Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes?' *Autophagy* 4, 849-950.

Komatsu, S., Moriya, S., Che, X. F., Yokoyama, T., Kohno, N., Miyazawa, K. 2013. 'Combined treatment with SAHA, bortezomib, and clarithromycin for concomitant targeting of aggresome formation and intracellular proteolytic pathways enhances ER stress-mediated cell death in breast cancer cells' *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 437, 41-47.

Kono, H, Rock, K. L. 2008. 'How dying cells alert the immune system to danger' *Nat Rev Immunol*, 8, 279–289.

Krysko, D. V., Vandenabeele, P. 2008. 'From regulation of dying cell engulfment to development of anti-cancer therapy' *Cell Death Differ*, 15, 29–38.

Kubicek, G. J., Werner-Wasik, M., Machtay, M., Mallon, G., Myers, T., et al. 2009. 'Phase I trial using proteasome inhibitor bortezomib and concurrent temozolomide and radiotherapy for central nervous system malignancies', *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 74, 433–439.

Kyle, R.A.,Gertz, M. A., Witzig, T.E. et al. 2003. 'Review of 1027 Patients With Newly Diagnosed Multiple Myeloma', *Mayo Clin Proc*, 78, 21-33.

Lancet, J. E., Duong, V. H., Winton, E. F., Stuart, R. K., Burton, M., et al. 2011. 'A phase I clinical-pharmacodynamic study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in combination with the proteasome inhibitor bortezomib in advanced acute leukemias.' *Clin Cancer Res*, 17, 1140–1146.

Laubach, J., Richardson, P., Anderson, K. 2011. Multiple myeloma. *Annu Rev Med* 62, 249-264.

Lin, H. Y., Chen, C. S., Lin, S.P, Weng JR, Chen, C. S. 2006. 'Targeting histone deacetylase in cancer therapy' *Med Res Rev*, 26(4),397–413.

Lin, Z., Bazzaro, M., Wang, M. C., Chan, K. C., Peng, S., et al. 2009. 'Combination of proteasome and HDAC inhibitors for uterine cervical cancer treatment', *Clin Cancer Res*, 15, 570–577.

Lockshin, R. A. 2016. 'Programmed cell death 50 (and beyond)', *Cell Death Differ*, 23,10-7.

McIlwain, D. R., Berger, T., Mak, T. W. 2013. 'Caspase functions in cell death and disease' Cold Spring Harb Perspect Biol, 5,a008656.

Mann, B. S., Johnson, J. R., Cohen, M. H., Justice, R., Pazdur, R. 2007. 'FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma' Oncologist, 12, 1247–52.

Marks, P. A., Xu, W. S. 2009. 'Histone deacetylase inhibitors: potential in cancer therapy', J Cell Biochem, 107(4):600–8.

Marquard, L., Poulsen, C. B., Gjerdrum, L. M., de Nully Brown, P., Christensen, I. J., Jensen, P. B., et al. 2009. 'Histone deacetylase 1, 2, 6 and acetylated histone H4 in B-and T-cell lymphomas' Histopathology, 54(6),688–698.

Meister, S., Schubert, U., Neubert, K., Herrmann, K., Burger, R., Gramatzki, M., Hahn, S., Schreiber, S., Wilhelm, S., Herrmann, M., Jäck, H. M., Voll, R. E. 2007. 'Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. Cancer Res, 67: 1783-1792,

Mitsiades, C. S, Mitsiades, N. S., McMullan, C. J., et al. 2004. 'Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications', Proc Natl Acad Sci USA, 101, 540–45.

Mitsiades, N., Mitsiades, C. S., Richardson, P. G., McMullan, C., Poulaki, V., Fanourakis, G., et al. 2003. 'Molecular sequelae of histone deacetylase inhibition in human malignant B cells' Blood, 101(10),4055–4062.

Moreau, P., Attal, M., Facon, T. 2015. 'Frontline therapy of multiple myeloma', Blood, 125,3076-3084.

Moriya, S., Che, X. F., Komatsu, S., Abe, A., Kawaguchi, T., Gotoh, A., Inazu, M., Tomoda, A., Miyazawa, K. 2013. 'Macrolide antibiotics block autophagy flux and sensitize to bortezomib via endoplasmic reticulum stress-mediated CHOP induction in myeloma cells' Int J Oncol, 42, 1541-50.

Nagata, S., Suzuki, J., Segawa, K., Fujii, T. 2016. 'Exposure of phosphatidylserine on the cell surface', Cell Death Differ, 2016 Feb 19. doi: 10.1038/cdd..7.

O'Connor, O. A., Heaney, M. L., Schwartz, L., et al. 2006. 'Clinical experience with intravenous and oral formulations of the novel histonedecetylase inhibitor suberoylanilidehydroxamic acid in patients with advanced hematologic malignancies', J Clin Oncol, 24, 166–173.

Oakervee, H.E., Popat, R., Curry, N., Smith, P, Morris, C., et al. 2005. 'PAD combination therapy (PS-341/bortezomib, doxorubicin and dexamethasone) for previously untreated patients with multiple myeloma', Br J Haematol, 129, 755–762.

Obeng, E. A., Carlson, L. M., Gutman, D.M., Harrington, W. J. Jr, Lee, K. P., Boise L. H. 'Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells' *Blood* 107: 4907-4916, 2006.

Oerlemans, R., Franke, N.E., Assaraf, Y.G., Cloos, J., vanZantwijk, I., et al. 2008. 'Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein', *Blood*, 112, 2489–2499.

Pei, X. Y., Dai, Y., Grant, S. 2004. 'Synergistic induction of oxidative injury and apoptosis in human multiple myeloma cells by the proteasome inhibitor bortezomib and histone deacetylase inhibitors' *Clin Cancer Res*, 10, 3839–3852.

Periyasamy, Thandavan, S., Jackson, W.H., Samaddar, J.S., et al. 2010. 'Bortezomib blocks the catabolic process of autophagy via a cathepsin-dependent mechanism, affects endoplasmic reticulum stress and induces caspase-dependent cell death in antiestrogen-sensitive and resistant ER+ breast cancer cells.' *Autophagy*, 6,19-35.

Ri, M., Lida, S., Nakashima, T., et al. 2010. 'Bortezomib-resistant myeloma cell lines: a role for mutated PSMB5 in preventing the accumulation of unfolded proteins and fatal ER stress', *Leukemia*, 24, 1506-1512,

Richardson, P. G., Sonneveld, P., Schuster, M.W., Irwin, D., Stadtmauer, E. A., et al. 2005. 'Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma' *N Engl J Med*, 352, 2487–2498.

Richardson, P., Mitsiades, C., Colson, K., et al. 2008. 'Phase I trial of oral vorinostat (suberoylanilidehydroxamic acid, SAHA) in patients with advanced multiple myeloma', *Leuk Lymphoma*, 49, 502–507.

Ron, D., Walter, P. 2007. 'Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response' *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 519-529.

Sasakawa, Y., Naoe, Y., Inoue, T., Sasakawa, T., Matsuo, M., Manda, T., et al. 2003. 'Effects of FK228, a novel histone deacetylase inhibitor, on tumor growth and expression of p21 and c-myc genes in vivo', *Cancer Lett*, 195(2),161–8.

Smith, A.J., Dai, H., Correia, C., Takahashi, R., Lee, S.H., et al. 2011. 'Noxa/Bcl-2 protein interactions contribute to bortezomib resistance in human lymphoid cells', *J Biol Chem*, 286, 17682–17692.

Su, Y., Amiri, K. I., Horton, L. W., Yu, Y., Ayers, G. D., et al. 2010. 'A phase I trial of bortezomib with temozolomide in patients with advanced melanoma: toxicities, antitumor effects, and modulation of therapeutic targets' *Clin Cancer Res*, 16, 348–357.

Verfaillie, T., Salazar, M., Velasco G., Agostinis P., 2010. 'Linking ER stress to autophagy: potential implications for cancer therapy', *Int J Cell Biol*, 930509.

Wongtrakongate, P. 2015. 'Epigenetic therapy of cancer stem and progenitor cells by targeting DNA methylation machineries', *World J Stem Cells*, 7,137-48.

Yang, X. J., Seto, E. 2007. 'HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention' *Oncogene*, 26(37),5310–8.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Yrd. Doç. Dr. GÖKHAN OZAN ÇETİN
Proje No:	114S905
Proje Başlığı:	Multipl Myelomda Proteozom İnhibisyonu-Tabanlı Kombine Tedavinin Etkinliği
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	SİBEL HACIOĞLU
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	PAMUKKALE Ü. TIP F. DAHİLİ TIP BİLİMLERİ B. TIBBİ GENETİK ABD.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/01/2015 - 15/01/2016
Onaylanan Bütçe:	30000.0
Harcanan Bütçe:	29973.69
Öz:	<p>Multipl myelom (MM), antikor üreten plazma hücrelerinin malign transformasyonu sonucu oluşan bir kanser türüdür. Primer MM tedavisindeki ilerlemelere rağmen, MM hala tedavi edilemeyen bir hastalıktır ve MM'de daha etkin sonuçlar için kombinasyon tedavileri ile ilgili daha fazla prelinik çalışmalara gereksinim vardır.</p> <p>MM tedavisinde proteazom inhibitörü olan bortezomib (BTZ)-tabanlı kombine tedavilerle ilgili prelinik çalışmaların sonuçları, bu kombinasyonların klinik etkinliklerinin beklenenden daha az olduğunu göstermektedir. Bu projede BTZ, vorinostat (SAHA), 5-azasitidin (5-AzaC) ve bafilomisin (BAF)'i içeren proteazom inhibisyonu-tabanlı kombine tedavinin MM hücre sitotoksitesi üzerinde etkinliğini değerlendirmeyi ve bu etkinliğin hangi programlı hücre ölümü/ölümleri üzerinden gerçekleştiğini belirlemeyi amaçladık</p> <p>Proje kapsamında öncelikle U266B1 ve RPMI 8226 MM hücre dizilerinde BTZ, SAHA, 5-AzaC ve BAF ajanlarının tek tek ve dördü kombinasyon IC50 değerleri belirlendi. Kullanılan ajanların MM hücre dizilerinde sitotoksik etkilerinin apoptoz ve otofaji açısından değerlendirilmesi amacıyla Annexin V boyamasıyla flow sitometri ve kaspaz-3 ve kaspaz-7 proteinlerine yönelik western blotlama yöntemleri kullanıldı. Otofaji açısından ise akridin oranj boyasıyla floresan mikroskopik analiz ve LC3 ve beclin-1 proteinlerinin western blot analizi uygulandı. Son olarak hücre dizilerindeki sitotoksitenin endoplazmik retikulum (ER) stresi ile ilişkisi açısından CHOP ve XBP1 genlerinin ekspresyon analizleri kantitatif gerçek zamanlı PCR ile gerçekleştirildi.</p> <p>BTZ, BAF, SAHA ve 5-AzaC'dan oluşan dördü kombinasyon tedavisi, protein degradasyon sistemlerinin eş zamanlı baskılanmasına yol açarak MM hücrelerinde ER stresini artırmaktadır. Bu da CHOP gibi ER-stresi aracılı apoptotik sinyallerin aktivasyonuna neden olarak, MM'da güçlü bir biçimde apoptozu uyandır.</p> <p>BTZ, SAHA, 5-AzaC ve BAF'i içeren proteozom inhibisyonu-tabanlı kombine tedavinin MM hücre sitotoksitesi üzerinde etkinliğini değerlendirmeyi hedefleyen bu prelinik çalışmadan elde edilen veriler, özellikle relaps/refraktör MM hastalarının tedavisinde alternatif yeni yaklaşımları sunması ve in vivo çalışmaları kapsayan yeni projelerin oluşturulmasına olanak sağlaması açısından önemli olacaktır.</p>
Anahtar Kelimeler:	Multipl myelom, bortezomib, ER-stresi, otofaji, apoptoz
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır