



Proteozom inhibitörü Carfilzomib'in multipl miyelom hücrelerinde piroptosis hücre ölüm yolağı üzerine olan etkisi

© Dilara Akçora Yıldız¹, © Yakuphan Baykan¹, © Fadime Aşık¹

¹ Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Burdur, Türkiye.

Öz

Proteozom inhibitörü Carfilzomib'in multipl miyelom hücrelerinde piroptosis hücre ölüm yolağı üzerine olan etkisi

Amaç: Multipl miyelom (MM), monoklonal antikör salgılayan anormal plazma hücrelerinin kemik iliğinde aşırı birikimi ile karakterize bir B hücre malignitesidir. Klinik uygulamalarda ikinci nesil proteozom inhibitörü carfilzomib (CFZ), relaps veya tedaviye dirençli hastaların tedavi rejimlerinde kullanılmaktadır. Ancak, MM hücrelerinde CFZ'in tetiklediği hücre ölümü mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu çalışmanın amacı, MM hücrelerinde CFZ'in apoptotik olmayan düzenli hücre ölüm yolaklarından biri olan piroptosis üzerine olan etkisinin araştırılmasıdır.

Yöntem: İnsan RPMI 8226, U266 ve NCI H929 MM hücre hatları, CFZ'in IC50 dozları ile 48 saat süre boyunca muamele edildi. Muamele edilen hücrelerde piroptosisin önemli substratları olan GSDMD ve GSDME ile Bax ve Bcl-2 genlerinin mRNA düzeylerindeki farklılıklar kantitatif eş zamanlı PCR (qPCR) yöntemiyle belirlendi.

Bulgular: NCI H929 ve RPMI 8226 hücrelerinde CFZ uygulamasının hem GSDMD hem de GSDME mRNA düzeylerinde anlamlı artışa neden olduğu belirlenirken, U266 hücrelerinde ise sadece GSDME mRNA seviyesinde anlamlı bir artış tespit edildi ($p<0.05$). MM hücrelerinde CFZ uygulaması Bax mRNA ifadesinde genel bir artışa neden olurken sadece RPMI 8226 hücrelerinde bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu. CFZ ile muamele edilen MM hücrelerinde Bcl-2 mRNA seviyesinde ise bir değişiklik saptanmadı.

Sonuç: Bu çalışmada, ilk kez CFZ'in MM hücrelerinde piroptosis ölüm yolağını da tetikleyerek anti-miyelom özellik gösterebileceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Multipl miyelom, Proteozom inhibitörü, Carfilzomib, Piroptosis, Gasdermin E

Abstract

The effect of proteasome inhibitor Carfilzomib on pyroptosis cell death pathway in multiple myeloma cells

Objective: Multiple myeloma (MM), characterized by excessive accumulation of monoclonal antibody-secreting abnormal plasma cells in the bone marrow, is a B-cell malignancy. In clinical practice, the second-generation proteasome inhibitor Carfilzomib (CFZ) is used in the treatment regimens of relapsed or treatment-resistant patients. However, the mechanisms of CFZ-induced cell death in MM cells have not been fully elucidated. The aim of this study is to investigate the effect of CFZ on pyroptosis, which is one of the regulated non-apoptotic cell death pathways in MM cells.

Method: Human NCI H929, RPMI 8226, and U266 MM cell lines were treated with IC50 doses of CFZ for 48 hours. In treated cells, the differences in mRNA levels of GSDMD and GSDME, which are important substrates of pyroptosis, and in mRNA levels of Bax as well as in mRNA levels of Bcl-2 were determined by quantitative real-time PCR (qPCR) method.

Results: CFZ treatment led to a significant increase in GSDMD and GSDME mRNA levels in NCI H929 and RPMI 8226 cells, while a remarkable increase was detected only in GSDME mRNA levels in U266 cells ($p<0.05$). Furthermore, CFZ treatment in MM cells showed a trend toward a significant increase in Bax mRNA expression, and this increase was statistically significant only in RPMI 8226 cells. In MM cells treated with CFZ, Bcl-2 mRNA levels were found to be unchanged.

Conclusion: This study for the first time determined that CFZ might show an anti-myeloma effect by triggering the pyroptosis in MM cells.

Keywords: Multiple myeloma, Proteasome inhibitor, Carfilzomib, Pyroptosis, Gasdermin E

Nasıl Atıf Yapmalı: Yıldız DA, Baykan Y, Aşık F. Proteozom inhibitörü Carfilzomib'in multipl miyelom hücrelerinde piroptosis hücre ölüm yolağı üzerine olan etkisi. MKÜ Tıp Dergisi. 2022;13(46):132-137. <https://doi.org/10.17944/mkutfd.969159>

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Dilara Akçora Yıldız, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Burdur, Türkiye.

Email: dilaraakcora@mehmetakif.edu.tr

ORCID id: 0000-0003-2586-4385

Gelis/Received: 24 Ekim 2021

Kabul/Accepted: 16 Aralık 2021

GİRİŞ

Multipl miyelom (MM), monoklonal antikor salgılayan anormal plazma hücrelerin kemik iliğinde aşırı birikimi ile karakterize bir B hücre malignitesi olup, tüm hematolojik kanserlerin %10'unu oluşturmaktadır. Son yıllarda tedavisindeki çarpıcı gelişmelere rağmen çoğu hastanın kaçınılmaz bir şekilde relaps ve mevcut tedavilere dirençli hale gelmesinden (refrakter) dolayı hâlâ öldürücü maligniteler arasında yer almaktadır (1). Klinikte, ikinci nesil proteazom inhibitörü carfilzomib (CFZ) nükseden ve/veya dirençli MM hastalarının tedavisinde kullanılmaktadır. MM hücreleri yüksek oranlarda antikor üretip salgıladıklarından, protein kalite kontrol kapasiteleri artmıştır. Protein kalite kontrolünde önemli rol oynayan proteazom, hücre içi proteinlerin parçalanmasından veya işlenmesinden sorumlu olan çok enzimli bir katalitik komplekstir (2). Proteinlerin 76 aminoasitlik ubiquitin ile işaretlenmesini sağlayan ubiquitinasyondan sonra proteazomal bozunma gerçekleşir. Proteazom inhibe edilirse, hücre içi proteinlerin birikmesine yol açarak hücrenin ölümüne sebep olmaktadır. Bu nedenle, proteazom inhibisyonu MM için oldukça etkili bir tedavi yöntemidir. CFZ, proteazomun kimotripsin benzeri aktivitesi için daha fazla seçiciliğe sahiptir ve geri döndürülemez şekilde bağlanarak aktiviteyi inhibe etmektedir. Bu nedenle, birinci nesil proteazom inhibitörü bortezomibe göre hücrelerde daha etkilidir ve daha az toksik etki göstermektedir (2).

Apoptotik olmayan düzenli hücre ölümü yollarından biri olan piroptosis, çeşitli patojenle ilişkili moleküler modeller (PAMP'ler) ve hasarla ilişkili moleküler modellere (DAMP'ler) yanıt olarak pro-inflamatuvar kaspazların aktivasyonu ve bu aktivasyonun bir sonucu olarak gasdermin ailesinin üyeleri tarafından hücre membranında çapı 10-14 nm olan porların oluşturulması ile karakterizedir (3). İnsan gasdermin ailesi üyeleri GSDMA, GSDMB, GSDMC, GSDMD, GSDME ve PJVK (DFNB59) olup, N-terminal bölgelerinde güçlü dizi benzerliği paylaşmaktadırlar. Başlangıçta, piroptoziste, pro-inflamatuvar kaspazlar tarafından GSDMD'nin kesimlenerek aktif formuna dönüşmesi, hem IL-1 β ve IL-18'i içeren inflamatuvar araçların salınmasına yol açtığı hem de hücre zarında porlar meydana getirerek terminal hücre lizisine neden olduğu kabul edilmiştir. Son dönem çalışmalar, GSDMD'nin yanı sıra, gasdermin ailesinin diğer üyelerinin de piroptosis hücre ölümüne katıldığını göstermiştir. Kaspaz-3 (CASP3) tarafından GSDME'nin kesimlenmesinin, kemoterapi uygulanan bazı kanser hücrelerinde klasik olmayan piroptozisi tetiklediği gösterilmiştir (4). Ancak, MM hücrelerinde tedavide kullanılan CFZ'in piroptosis ölüm yolağı üzerine olan etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu bağlamda daha fazla bilimsel çalışma, MM hücrelerinde CFZ'in etkilediği hücre ölüm tiplerini göstermek için gereklidir.

Düzenli hücre ölümü olan apoptozisin regülasyonunda Bcl-

2 ailesi önemli rol oynamaktadır. Bcl-2 ailesinin Bcl-2 ilişkili X (Bax) ve Bcl-2 homolog antagonisti (Bak) gibi pro-apoptotik üyeleri artmış mitokondriyal dış zar geçirgenliğine aracılık ederken, B-hücre lenfoma-2 (Bcl-2), Bcl-XL veya indüklenmiş miyeloid lösemi hücre farklılaşması proteini (Mcl-1) gibi anti-apoptotik üyeleri sağ-kalımı uyarmaktadır (5). Güncel bir çalışma, Bcl-2'nin, gözenek oluşturan proteinlerden Bax ve Bak'ı doğrudan aktive eden BH3 alanı içeren proteinleri etkisizleştirerek apoptozisi önlediği ve hücre hayatta kalmayı desteklediğini göstermiştir (6). Aynı çalışmada, hem GSDMD hem de karışık soy kinaz alanı benzeri (MLKL)'nde BH3 benzeri bir alan tanımlanmış ve Bcl-2'nin bu alanla etkileşime girmesinden ötürü sadece bir anti-apoptotik protein olarak değil, aynı zamanda bir anti-piroptotik ve anti-nekroptotik protein olarak da işlev gördüğü bulunmuştur (6). Bu çalışmanın amacı, MM hücrelerinde CFZ'in piroptosis hücre ölümünü nasıl etkilediğinin aydınlatılmasına katkıda bulunmaktır.

YÖNTEM

Bu çalışma, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir.

Hücre Kültürü

RPMI 8226, U266 ve NCI H929 insan MM hücre hatları ATCC'den satın alındı ve %10 fetal bovin serum (FBS), 100U/ml penisilin, 200 μ g/ml streptomisin içeren L-glutamin ve Hepses'li RPMI 1640 besiyerinde %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş ortamda 37°C'de kültüre edildi. Altı kuyucuklu kültür kaplarına 1x10⁶ hücre/kuyu şeklinde ekilen RPMI 8226, U266 ve NCI H929 hücrelerine sırası ile 27nm, 60nm ve 6nm dozlarda CFZ (PR-171, Selleckchem, ABD) uygulanarak 48 saat kültürleri yapıldı.

Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Kontrol ve CFZ uygulanan gruplar CFZ ile 48 saat muamele edilmelerinin ardından, MM hücrelerinden total RNA izolasyonu, Nucleozol (Macherey-Nagel, GERMANY) kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen RNA'lar spektrofotometrede (Epoch, Biotek, ABD) 260/280 nm dalga boyunda ölçülerek μ l'deki μ g değerleri belirlendi. cDNA sentezi, her bir örnek için 1 μ g RNA'dan iScript cDNA sentez kiti (cat:1708890, Bio-rad, ABD) kullanılarak üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirildi.

Eş Zamanlı-Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Her bir cDNA örneğinin kantitatif ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) analizi, LightCycler 480 SYBR Green I master mix (Roche Applied Sci. ABD) kullanılarak ve GAPDH normalizasyonu ile Bio-rad CFX (Bio-rad, ABD) sisteminde gerçekleştirildi. qPCR reaksiyonu 10 μ l toplam hacimde, LightCycler 480 SYBR Green I master mix 5 μ l, 0,5 μ l forward primer, 0,5 μ l revers primer, 1 μ l cDNA ve dH₂O'u içerdi. qPCR reaksiyonu için kullanılan GSDMD,

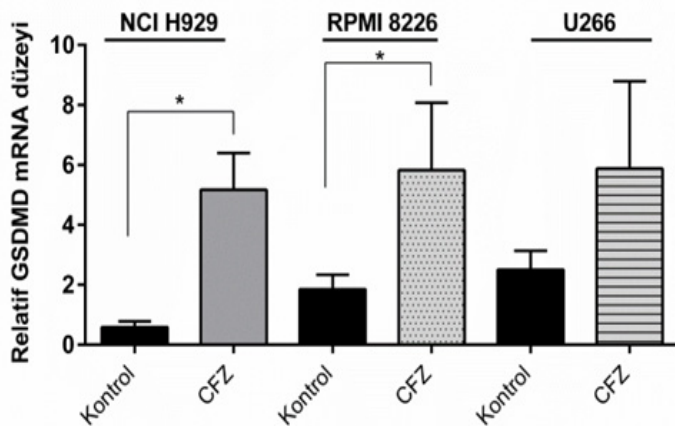
GSDME, Bcl-2 ve GAPDH primer dizileri: GSDMD Primer R: TGCCCTGTATCTGCCCATCC F: TGTGTCAACCTGTCTATCAAGGA
 GSDME Primer R: CTTTGTGAAATACGAGGGCAAG F: GGTTCCAAATGAAGACTGGCTC
 Bcl-2 Primer R: AACAAAGACGCCAACATTCTC F: GGGATTGCCCTGATTATTTACA
 GAPDH Primer R: TGAGTCCTCCACGATACCA F: ATGAGAAGTATGACAACAAGCCT'dir. qPCR reaksiyonu sıcaklık döngüsü: 45 döngü olmak üzere 95°C'de 15 sn denatürasyon, 60°C'de 15 sn annealing ve 72°C'de 1 dk uzama şeklinde gerçekleştirildi. İlgili genlerin mRNA ifade düzeyleri gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaza (GAPDH) mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi. Bağlı mRNA ifade değişiklikleri 2-ΔCt eşik yöntemi kullanılarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

En az üç farklı zamanda yapılan deneyler sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizi, GraphPad Programı'nda Student-t test yöntemi kullanılarak yapıldı. $p < 0.05$ istatistiksel değerli olarak dikkate alındı. Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

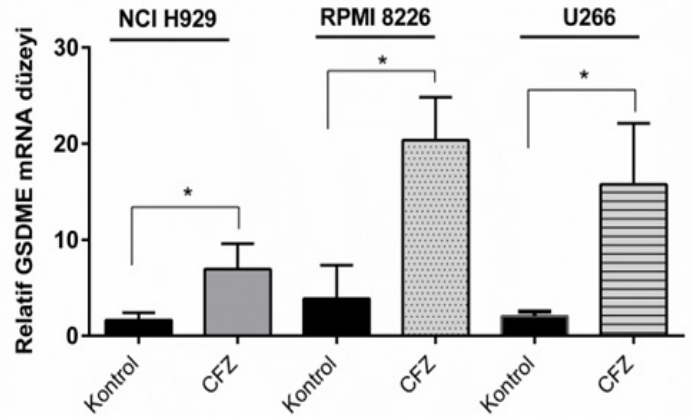
BULGULAR

CFZ'in insan MM hücrelerinde piroptozis ölüm yolağı üzerine olan etkisini belirlemek için, CFZ'in IC50 dozları ile 48 saat muamele edilen NCI H929, RPMI 8226 ve U266 hücrelerinde piroptozis sırasında hücre zarında por oluşturan GSDMD ve GSDME'nin mRNA seviyeleri qPCR ile araştırıldı. Elde edilen sonuçlara göre, kontrol grubuna kıyasla; CFZ uygulanan NCI H929 ve RPMI 8226 hücrelerinde hem GSDMD hem de GSDME mRNA ifadelerinde anlamlı artış saptandı ($p < 0.05$) (Şekil 1-2). U266 hücrelerinde ise GSDMD mRNA ifadesinde artışa yönelik bir trend gözlemlenirken, GSDME mRNA ifadesinde anlamlı bir artış belirlendi ($p < 0.05$) (Grafik 1-2).



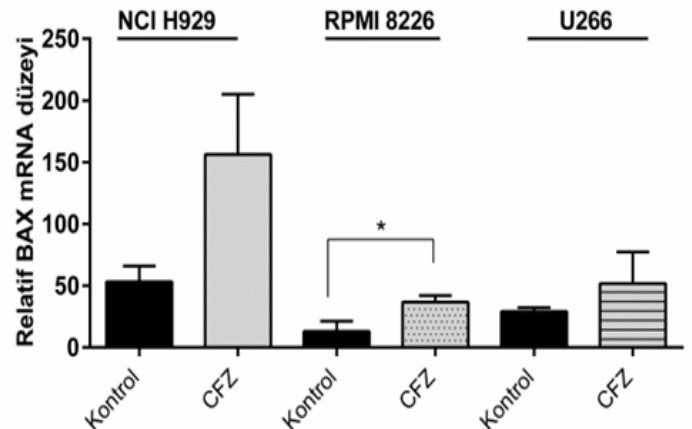
Grafik 1. CFZ uygulamasının NCI H929, RPMI 8226 ve U266 hücrelerinde

GSDMD mRNA düzeyine etkisi.



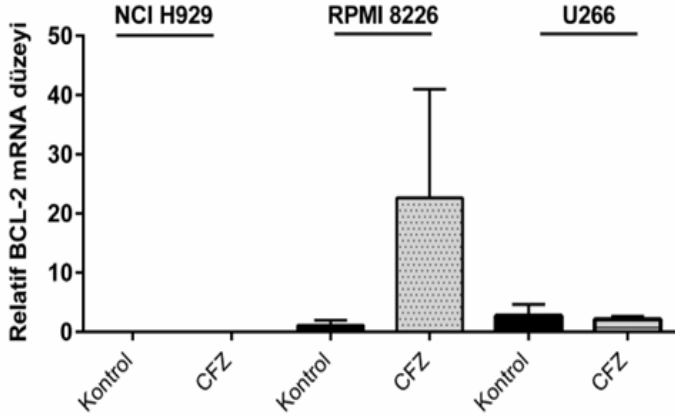
Grafik 2. CFZ uygulanan MM hücrelerinde anlamlı olarak artan GSDME mRNA ifadesi.

MM hücrelerinde CFZ uygulamasının, apoptozisin uyarılmasında görevli Bax geninin mRNA ifadesinde genel bir artışa neden olduğu gözlemlendi. Bu artışın NCI H929 ve U266 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu ($p > 0.05$) (Şekil 3). RPMI 8226 hücrelerinde ise CFZ uygulamasının Bax mRNA seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı tespit edildi ($p < 0.05$) (Grafik 3).



Grafik 3. MM hücrelerinde CFZ uygulamasının Bax mRNA düzeyine etkisi.

Son dönem çalışmalar, apoptozisi baskılayan genlerden Bcl-2'nin aynı zamanda anti-piroptotik rolünü vurguladığından; MM hücrelerinde CFZ uygulamasının Bcl-2 mRNA ifadesi üzerine etkisi qPCR ile araştırıldı. qPCR sonuçlarına göre, CFZ uygulanan NCI H929, RPMI 8226 ve U266 hücrelerinde Bcl-2 mRNA ifadesinde önemli bir değişim gözlemlenmedi (Grafik 4).



Grafik 4. CFZ uygulamasının NCI H929, RPMI 8226 ve U266 MM hücrelerinde Bcl-2 mRNA düzeyine etkisi.

TARTIŞMA

Multipl Miyelom (MM), plazma hücrelerinin habisleşmesi sonucu oluşan kan kanseridir. MM tedavisinde CFZ dâhil yeni ilaçların ve bunların kemoterapötik kombinasyonlarının kullanımı tedavide yüksek oranda iyileşmeye neden olmasına rağmen, hastalarda kullanılan terapilere karşı kemo-direnç gelişmesi, MM'nin hâlâ tam kür sağlanamayan hastalıklar arasında yer almasına neden olmaktadır. Karşılaşılan kemo-dirençten üstesinden gelenebilmesi için CFZ dâhil tedavide kullanılan ajanların etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına gerek duyulmaktadır.

Bu çalışmada ilk kez MM hücrelerinde CFZ'in, piroptozis ölüm yolağında hücre membranında por oluşturarak hücrenin ölümüne yol açan GSDMD ve GSDME'nin mRNA ifadelerini arttırarak piroptozis ölüm yolağını uyardığına dair bulgular elde edilmiştir. Ayrıca, MM hücrelerinde CFZ uygulaması, pro-apoptotik Bax mRNA seviyesinde genel bir artışa yol açmış, anti-apoptotik ve anti-piroptotik Bcl-2 mRNA seviyesinde ise bir değişikliğe neden olmamıştır.

CFZ, ikinci nesil proteozom inhibitörü olup, nükseden ve/veya Bortezomib'e karşı dirençli MM hastalarının tedavisinde kullanılmaktadır (7). Genel olarak hücrelerde proteozom inhibisyonu, endoplasmik retikulumda (ER) yanlış katlanmış ve poliübikitinlenmiş proteinlerin birikmesi sonucunda ER stres yanıtının oluşumu ile mitokondriden sitokrom c ve serin proteazların salınımı ile sonuçlanmaktadır (8). Apoptozisin başlatılması, sitokrom c salınımı ve kaspaz-9 aktivasyonunu içeren içsel bir yol veya daha sonra ortak bir efektör olan kaspaz-3'te birleşen Fas/kaspaz-8'e bağlı sinyal yolağının aktivasyonunun aracılık ettiği dışsal bir yol aracılığıyla gerçekleşebilmektedir (9). Çalışmamızda 48 saat süre zarfında CFZ ile muamele edilen RPMI 8226 hücrelerinde içsel yolağın aktivasyonunda rol oynayan Bax'ın mRNA ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış, içsel

yolağın baskılanmasında rol oynayan ve aynı zamanda anti-piroptotik etkiye sahip olduğu belirtilen Bcl-2 ifadesinde ise bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızla uyumlu olarak, Kuhn ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada, 24 ve 48 saat süre boyunca CFZ uygulanan RPMI 8226 hücrelerinde kontrole kıyasla Bax protein seviyesinde anlamlı bir artış tespit edilmiştir (10). Ancak, bu çalışmada Bcl-2 ifadesi araştırılmamıştır.

CFZ'in MM hücrelerinde içsel apoptozis yolağının aktivasyonuna ilaveten dışsal kaspaz yollarıyla da apoptozisi uyardığı gösterilmiştir (11). Dışsal apoptotik yolda TNF ailesi ölüm ligandları önemli rol oynamaktadır. Aynı zamanda, TNF ailesi ölüm ligandları, düzenli apoptotik olmayan hücre ölüm yolağı olan nekroptoziste de önemli rol oynamaktadır. Nitekim, proteozom inhibisyonunun poliübikitinlenmiş reseptör etkileşimli serin-threonin protein kinaz 3 (RIPK3)'e atfedilen bir mekanizma yoluyla fare fibroblastlarında nekroptozisi indüklediği, ancak insan hücrelerinde nekroptozisi tetiklemeden modifiye RIPK3 birikimine neden olduğu rapor edilmiştir (12,13). Sonuçta, insan hücrelerinde proteozom inhibisyonunun, ölüm kompleksi agregasyonunu azaltarak nekroptozisi bloke ettiği gösterilmiştir (13). Ayrıca, CFZ'in otofaji ölüm yolağının gerçekleşmesinde önemli rol oynayan otofagozomların oluşumunda bir artış sağladığı, ancak apoptozisin ilerlemesi ile muhtemel Beclin 1 ve p62 inaktivasyonu nedeniyle otofajinin gerçekleşmediği; ancak otofajiyi bloke eden klorokin ile CFZ birlikte uygulamasının in vitro ve in vivo olarak apoptozisi kuvvetlendirdiği rapor edilmiştir (14).

Piroptozis, pro-inflamatuvar kaspazların aktivasyonu sonucu olarak gasdermin ailesinin üyeleri tarafından hücre membranında porların oluşturulması ile inflamatuvar interlökin-1 (IL-1) aile üyelerinin (IL-1 ve IL-18) salınımı ile karakterize bir apoptotik olmayan DHÖ formudur (15). Hücreler, çeşitli ekzojen veya endojen faktörler tarafından uyarıldığında, gasderminler bazı kaspazlar veya granzimler tarafından kesimlenmektedir. Bu kesimlenmenin sonucu olarak, gasdermin N-terminal gözenek oluşturma alanı (PFD), C-terminal baskılayıcı domaininden ayrılır. Daha sonra N-terminal PFD oligomerizasyonu hücre zarında gözenekler oluşturarak, inflamatuvar moleküllerin salınmasına ve piroptotik hücre ölümüne neden olmaktadır (15). Yapılan çalışmalar, gasdermin ailesi üyelerine ait ekspresyon seviyelerinin çeşitli tümörlerin oluşumu ve ilerlemesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Meme kanserinde, yüksek GSDMB ifadesinin tümör ilerlemesi ile ilişkili olduğu ve GSDMB'nin aşırı ekspresyonunun HER-2'nin hedeflenen tedavisine karşı zayıf bir yanıt göstermesinden dolayı GSDMB'nin meme tümörleri için yeni bir prognostik belirteç olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir (16). İlaveten, meme kanserinde yüksek GSDMC seviyeleri ile düşük GSDME ekspresyonunun zayıf sağ-kalım ile ilişkili olduğu

belirtilmiştir (15,17). Kolorektal kanser hücrelerinde yapılan çalışmalarda, aşırı GSDMC ifadesinin hücre proliferasyonunu teşvik ettiği ve bu nedenle GSDMC'nin kolorektal kanserde umut verici bir terapötik hedef olabileceği (18), GSDMD'nin ise normal kolorektal epitel hücrelerine kıyasla kolon karsinom hücrelerinde ifadesinin azaldığı gösterilmiştir (19).

Çalışmamızda, MM hücrelerinde CFZ uygulamasının GSDMD ve GSDME'nin mRNA ifadelerini istatistiksel olarak anlamlı arttırarak piroptosis ölüm yolağını uyarabileceğini tespit ettik. Bizim çalışmamızla uyumlu olarak, Rogers ve ark. B16-Ova melanoma hücrelerinde piroptosisle ilişkili protein GSDME'nin tümör baskılayıcı bir etki gösterdiğini bulmuşlardır (20). Ek olarak, BRAF ve MEK inhibitörlerine ait kombinasyonun, melanom hücrelerinde GSDME'ye bağlı piroptosisi indüklediği bildirilmiştir (21). Ayrıca, kemoterapötik ilaçların, yüksek GSDME ekspresyonuna sahip mide kanseri hücrelerinde apoptozisden ziyade piroptosisi indüklediği bulunmuştur (22). Yang ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, THP-1 akut miyeloid lösemi (AML) hücrelerinde, düşük toksisiteye sahip küçük bir molekül olan piridoksin (B6 vitamini) uygulamasının GSDME aracılı piroptosisi uyarması, piridoksinin AML tedavisi için potansiyel bir ilaç olabileceğini düşündürmektedir (23).

SONUÇ

Elde ettiğimiz sonuçlar, ilk kez MM hücrelerinde CFZ'in, apoptozise ilaveten piroptosis ölüm yolağını da uyararak anti-miyelom şekilde etki edebileceğini göstermektedir. Ancak, elde ettiğimiz sonuçların CFZ uygulanan MM hücre hatları ile MM hastalarından elde edilen primer hücre hatlarında protein seviyesinde teyit edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

BİLDİRİMLER

Çıkar Çatışması

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 2209 A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı (1919B012001134) tarafından desteklenmiştir.

Etik Beyan

Bu çalışmada ATCC firmasından satın alınan insan multipl miyelom hücre hatları kullanıldığından etik kurul onayına ihtiyaç bulunmamakta olup Helsinki Bildirgesi kriterleri göz önünde bulundurulmuştur.

Yazarlık Katkıları:

Konsept: D.A.Y, Dizayn: D.A.Y, Veri Toplama veya İşleme: Y.B, F.A, Analiz veya Yorumlama: D.A.Y, Y.B, Literatür Arama: D.A.Y, Y.B, Yazan: D.A.Y.

KAYNAKLAR

- Corre J, Munshi NC, Avet-Loiseau H. Risk factors in multiple myeloma: is it time for a revision? *Blood*. 2021;137(1): 16-19. <https://doi.org/10.1182/blood.2019004309>.
- Groen K, van de Donk NWCJ, Stege C, Zweegman S, Nijhof IS. Carfilzomib for relapsed and refractory multiple myeloma. *Cancer Manag Res*. 2019;11: 2663-2675. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S150653>.
- Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018;25(3): 486-541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.
- Robinson N, Ganesan R, Hegeds C, Kovács K, Kufer TA, Virág L. Programmed necrotic cell death of macrophages: Focus on pyroptosis, necroptosis, and parthanatos. *Redox Biol*. 2019;26: 101239. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101239>.
- Touzeau C, Maciag P, Amiot M, Moreau P. Targeting Bcl-2 for the treatment of multiple myeloma. *Leukemia*. 2018;32(9): 1899-1907. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0223-9>.
- Shi C-S, Kehrl JH. Bcl-2 regulates pyroptosis and necroptosis by targeting BH3-like domains in GSDMD and MLKL. *Cell Death Discov*. 2019; 9;5: 151. <https://doi.org/10.1038/s41420-019-0230-2>.
- Maral S, Albayrak M, Pala Ç. Current Treatment Approaches to Multiple Myeloma with New Agents. *J Clin Exp Investig*. 2018;9(2): 103-112. <https://doi.org/10.5799/jcei.433823>
- Ri M. Endoplasmic-reticulum stress pathway-associated mechanisms of action of proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Int J Hematol*. 2016;104(3):.273-80. <https://doi.org/10.1007/s12185-016-2016-0>.
- Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med*. 2005;258(6): 479-517. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2005.01570.x>.
- Kuhn DJ, Chen Q, Voorhees PM, Strader JS, Shenk KD, Sun CM, et al. Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood*. 2007;110(9): 3281-90. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-065888>.
- Han B, Yao W, Oh Y-T, Tong J-S, Li S, Deng J, et al. The novel proteasome inhibitor carfilzomib activates and enhances extrinsic apoptosis involving stabilization of death receptor 5. *Oncotarget*. 2015;6(19): 17532-42. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3947>.
- Moriwaki K, Chan FK-M. Regulation of RIPK3- and RHIM-dependent Necroptosis by the Proteasome. *J Biol Chem*. 2016;291(11): 5948-5959.

- <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.700997>.
13. Ali M, Mocarski ES. Proteasome inhibition blocks necroptosis by attenuating death complex aggregation. *Cell Death Dis.* 2018;9(3): 346.
<https://doi.org/10.1038/s41419-018-0371-x>.
 14. Jarauta V, Jaime P, Gonzalo O, de Miguel D, Ramírez-Labrada A, Martínez-Lostao L, et al. Inhibition of autophagy with chloroquine potentiates carfilzomib-induced apoptosis in myeloma cells in vitro and in vivo. *Cancer Lett.* 2016; 382(1):1-10.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.08.019>.
 15. Yu P, Zhang X, Liu N, Tang L, Peng C, Chen X. Pyroptosis: mechanisms and diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1): 128.
<https://doi.org/10.1038/s41392-021-00507-5>.
 16. Hergueta-Redondo M, Sarrió D, Molina-Crespo Á, Megias D, Mota A, Rojo-Sebastian A, et al. Gasdermin-B Promotes Invasion and Metastasis in Breast Cancer Cells. *PLoS One.* 2014;9(3): e90099.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090099>.
 17. Hou J, Zhao R, Xia W, Chang C-W, You Y, Hsu J-M, et al. PD-L1-mediated gasdermin C expression switches apoptosis to pyroptosis in cancer cells and facilitates tumour necrosis. *Nat Cell Biol.* 2020;22(10):1264-1275.
<https://doi.org/10.1038/s41556-020-0575-z>.
 18. Miguchi M, Hinoi T, Shimomura M, Adachi T, Saito Y, Niitsu H, et al. Gasdermin C Is Upregulated by Inactivation of Transforming Growth Factor β Receptor Type II in the Presence of Mutated Apc, Promoting Colorectal Cancer Proliferation. *PLoS One.* 2016;11(11): e0166422.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166422>.
 19. Ma Y, Chen Y, Lin C, Hu G. Biological functions and clinical significance of the newly identified long non-coding RNA RP1785F18.6 in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2018;40(5): 2648-2658.
<https://doi.org/10.3892/or.2018.6694>.
 20. Rogers C, Erkes DA, Nardone A, Aplin AE, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Gasdermin pores permeabilize mitochondria to augment caspase-3 activation during apoptosis and inflammasome activation. *Nat Commun.* 2019;10(1): 1689.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09397-2>.
 21. Smalley KSM. Two Worlds Collide: Unraveling the Role of the Immune System in BRAF–MEK Inhibitor Responses. *Cancer Discov.* 2020;10(2): 176-178.
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-1441>.
 22. Wang Y, Yin B, Li D, Wang G, Han X, Sun X. GSDME mediates caspase-3-dependent pyroptosis in gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;495(1): 1418-1425.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.156>.
 23. Yang W, Liu S, Li Y, Wang Y, Deng Y, Sun W, et al. Pyridoxine induces monocyte-macrophages death as specific treatment of acute myeloid leukemia. *Cancer Lett.* 2020;492: 96-105.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.08.018>.