

ŞEYMA PUNAR

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2022



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS)

**KDELR1 VE COPE GENLERİNİN MULTİPL MİYELOM
PATOGENEZİNDEKİ ROLÜ**

ŞEYMA PUNAR

**DANIŞMAN
PROF.DR. NESLİHAN ABACI**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2022

İTHAF



Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecim boyunca bana her zaman yardımcı olan, bütün sorularıma sevgi ve sabırla cevap veren, akademik alanda ilerlemem ve tezimi gerçekleştirmem için varolan bütün imkanları kullanmama olanak sağlayıp, bilgi birikimini benden esirgemeyen her fırsatta ilerlemem ve gelişmem için beni destekleyen şuanki konumuma gelmemde çok büyük emekleri olan sevgili danışman hocam Prof. Dr. Neslihan Abacı'ya aynı zamanda danışman hocam kadar değer verdiğim, deneyimine ve bilgi birikimine sonsuz saygı duyduğum çok değerli hocam Prof. Dr. Sema Sırma Ekmekci'ye çok teşekkür ederim.

Deneyimlerinden her zaman yararlandığım, manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, çok sevdiğim hocam Dr. Zeliha Emrence'ye ve bu yolda birlikte ilerlediğim her zaman desteğini hissettiğim sevgili arkadaşım Büneyan Tüzün ve tüm tez dönemim boyunca bana her zaman ve her anlamda destek olan çok değerli arkadaşım Damla Nur Şakar başta olmak üzere, genetik LAB-2 ailesinin değerli üyeleri; Dr. Melda Sarıman'a, Msc. İrem Coşkun'a Msc. Elif Nur Bozdağ'a, Bahadır Kasap'a Doç. Dr. Ferda Paçal'a ve Dr. Aris Çakiris'e

İlk günden beri gelişimime destek olan, tüm tez sürecimde yanımda olan, hafta sonları bile yardımını esirgemeyen, tüm olumsuzluklara rağmen beni motive eden bende emeği çok olan değerli Msc. Burcu Salman Yaylaz'a

Laboratuvara kısa sürede alışmamı sağlayıp samimiyetini her zaman hissettiğim her aradığımda yüzümü güldürüp bana hep destek olan çok değerli dostum Msc. Büşra Karaçam'a

Kısa sürede çok yakın arkadaşım olan kardeşim gibi gördüğüm, deneylerimde ve tüm tez sürecimde zaman fark etmeksizin her daim yanımda olup bana destek veren birlikte çok güldüğüm sevgili arkadaşım Berk İleri'ye

Bu yola birlikte başladığım, tüm sıkıntılı süreçlerimizde birbirimize destek olduğumuz her zaman arkamda olduğumu bildiğim bu sürecin en güzel şekilde geçmesine çok büyük katkısı olan canım dostum Duygu Bağcıçek'e

Tez çalışmamda kullandığım hücrelerin temininde çok büyük katkısı olan saygıdeğer Prof.Dr. Ali Uğur Ural ve çok değerli Dr. Meral Sarper'e

Eğitim hayatımın en başından beri bana maddi ve manevi her anlamda destek olup kararlarımın arkasında olan ve her zaman beni motive eden beni bugünlere getiren canım Anneme, her zaman kararlarımın saygı gösteren beni her daim destekleyen canım babama, iyi ki var dediğim küçüklüğümde beni destekleyip motive eden dünyalar tatlısı ablam Beyza Nur'a ve kardeşim olmasından büyük mutluluk duyduğum medikal destekçim her şeyim sevgili küçük kardeşim Zeynep'e çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37570

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
BEYAN.....	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
İTHAF.....	İİ
TEŞEKKÜR.....	İİİ
İÇİNDEKİLER	V
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Plazma Hücre Diskrazileri	3
2.1.1. Önemi Bilinmeyen Monoklonal Gamopati (MGUS).....	3
2.1.2. Smoldering Multipl Miyelom (SMM)	4
2.2. Multipl Miyelom (MM)	6
2.2.1. Epidemiyoloji.....	7
2.2.2. MM GENETİK DEĞİŞİMLERİ.....	8
2.2.2.1. Primer Genetik Değişimler	8
2.2.2.2. Sekonder Genetik Değişimler	9
2.2.3. MM ve Kemik İliği Mikroçevresi	12
2.2.4. MM TANI.....	13
2.2.4.1. MM Evreleme Sistemi	16
2.2.5. MM TEDAVİSİ	17
2.3. COPE Geni.....	19
2.3.1. COPI ARACILI TAŞIMA	21
2.4. KDELR1 Geni	24
2.5. RNA İNTERFERANS	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. Gereç	28

3.1.1. RPMI8226 ve U266 hücre hatları	28
3.1.2. Kimyasallar ve Kitler	28
3.1.3. Cihazlar	28
3.2. YÖNTEM	29
3.2.1. Hücre Kültürü	32
3.2.2. Hücre Sayısı ve Canlılığının Belirlenmesi	33
3.2.3. Optimizasyon Deneyleri	34
3.2.3.1. Lipozomal ajan ile transfeksiyon	34
3.2.3.2. Elektroporasyon yöntemi ile transfeksiyon.....	35
3.2.3.3. RNA izolasyonu	36
3.2.3.4. cDNA sentezi	37
3.2.3.5. Primer Tasarımı.....	38
3.2.3.6. qRT-PZR.....	39
3.2.4. Çalışma Grubu Deneyleri.....	40
3.2.4.1. Elektroporasyon ile siRNA transfeksiyonu.....	40
3.2.4.2. qRT-PZR yöntemi ile KDELR1 gen ifadesinin baskılanmasının kantitatif olarak belirlenmesi	41
3.2.4.3. qRT-PZR yöntemi ile COPE gen ifadesinin kantitatif olarak belirlenmesi	41
3.2.4.4. MTT Testi	41
3.2.4.5. Apoptoz Tayini.....	42
4. BULGULAR.....	44
4.1. Optimizasyon deneylerinin sonuçları	44
4.1.1. Lipozomal ajan ile yapılan optimizasyon deneyi sonuçları	44
4.1.2. Elektroporasyon yöntemiyle yapılan optimizasyon deneyi sonuçları.....	45
4.2. Deney gruplarında baskılanma oranları	47
4.3. Deney gruplarında COPE geninin qRT-PZR sonuçları	48
4.4. MTT testi sonuçları.....	49
4.5. Apoptoz tayin sonuçları	52
5. TARTIŞMA	56
KAYNAKLAR	61
HAM VERİLER	67
FORMLAR	68
ETİK KURUL KARARI	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.

PATENT HAKKI İZNİ	69
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	70
ÖZGEÇMİŞ	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Uluslararası Miyelom Çalışma Grubu Tanı kriterleri (27)	14
Tablo 2-2: Revize -ISS (28).....	16
Tablo 2-3: MM tedavisinde kullanılan ilaçlar (24).....	18
Tablo 3-1: RPMI 1640 besiyeri hazırlanması.....	32
Tablo 3-2: Lipofectamine 2000 ile yapılan optimizasyon deneyleri kuyu içeriği.....	34
Tablo 3-3: cDNA reaksiyonu karışım içeriği	37
Tablo 3-4: cDNA reaksiyon koşulları.....	37
Tablo 3-5: TBP, KDELR1 ve COPE primer dizi bilgileri.....	38
Tablo 3-6: Her bir kuyu için qRT-PZR reaksiyon karışımı.....	39
Tablo 3-7: qRT-PZR koşulları.....	40
Tablo 3-8: MTT testi kuyu başı eklenen DMSO miktarları	42
Tablo 4-1: Optimizasyon deneylerinde KDELR1 gen ifadesi baskılanma oranları	46
Tablo 4-2: U266 ve RPMI8226 hücrelerinde KDELR1 baskılanma oranları	48
Tablo 4-3: U266 hücreleri apoptoz deneyi hücre oranları	52
Tablo 4-4: RPMI8226 hücreleri apoptoz deneyi hücre oranları	53

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: MM oluşumu ve ilerlemesi (11).....	5
Şekil 2-2: Kemik iliğinde plazma hücrelerinden MM hücrelerinin oluşumu (15)	7
Şekil 2-3: MM’de primer ve sekonder genetik değişimler (21)	11
Şekil 2-4: COPE geninin kromozom lokasyonu (32)	19
Şekil 2-5: COPI kompleksinin kristal görüntüsü (33)	20
Şekil 2-6: ER -Golgi arasında anterograd ve retrograd taşıma (38)	22
Şekil 2-7: COPI tomurcuklanması ve kargo taşınımı (30)	23
Şekil 2-8: KDELR1 geninin kromozom lokasyonu (42)	24
Şekil 2-9: KDELR1 protein yapısı (44)	25
Şekil 2-10: STRING veritabanında KDELR1 ve COPE genlerinin etkileşimi (49).....	26
Şekil 2-11: siRNA aracılı RNA interferans (54)	27
Şekil 3-1:İş akış şeması.....	31
Şekil 3-2: U266 hücreleri ışık mikroskobu 10x mercek görüntüsü	33
Şekil 3-3: RPMI8226 hücreleri ışık mikroskobu 10x mercek görüntüsü	33
Şekil 4-1: Lipozomal ajanla yapılan farklı siRNA miktarlarında baskılama sonuçları ..	44
Şekil 4-2: Farklı sürelerde lipozomal ajanla yapılan siRNA baskılanma oranları	45
Şekil 4-3: Elektroporasyonla yapılan farklı siRNA miktarlarında baskılamaları.....	46
Şekil 4-4: U266 hücrelerinin 24 ve 48 saat KDELR1 gen ifadesi sonuçları	47
Şekil 4-5: RPMI8226 hücrelerinde KDELR1 gen ifadesi sonuçları.....	48
Şekil 4-6: RPMI 8226 hücrelerinde COPE gen ifadesi sonuçları.....	49
Şekil 4-7: U266 hücrelerinde COPE gen ifadesi sonuçları.....	49
Şekil 4-8: U266 hücreleri MTT deneyi proliferasyon sonuçları.....	50
Şekil 4-9: RPMI8226 hücreleri MTT deneyi proliferasyon sonuçları.....	51
Şekil 4-10: U266 hücreleri 24 ve 48 saat MTT deneyleri	51
Şekil 4-11: RPMI8226 hücreleri 24 ve 48 saat MTT deneyleri	51
Şekil 4-12: U266 hücreleri apoptoz deneyi sonuçları pasta grafiği.....	54
Şekil 4-13: RPMI8226 hücreleri apoptoz deneyi sonuçları pasta grafiği	54
Şekil 4-14: U266 hücreleri apoptoz deneyi konfokal mikroskop görüntüleri	55
Şekil 4-15: RPMI8226 hücreleri apoptoz deneyi konfokal mikroskop görüntüleri	55

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ARF1	ADP ribozilasyon faktörü 1
CCDN1	siklin D1
CCDN2	siklin D2
CCDN3	siklin D3
CDKN1B	Sikline bağımlı kinaz inhibitörü 1B
CDKN2C	Sikline bağımlı kinaz inhibitörü 2C
cDNA	komplementer DNA
CNV	Kopya sayısı değişimi
CKS1B	Sikline bağımlı kinaz düzenleyici alt birim 1
COPE	COPI epsilon alt birimi
COPI	Koatomer protein kompleks I
CRAB	hiperkalsemi, böbrek yetmezliği, anemi ve kemik lezyonları
CXCL12	Kemokin ligand 2
CXCR4	Kemokin resptör 4
dL	desilitre
DNA	Deoksi Ribonükleik Asit
DMSO	dimetilsülfoksit
dsDNA	çift iplikli DNA
dsRNA	çift iplikli RNA
DSS	Durie-Salmon Evreleme
ER	Endoplazmik retikulum
ERS	Endoplazmik retikulum sinyal dizisi
FBS	Fetal Bovin Serum
FISH	Floresan İn Situ Hibridizasyon
FGFR3	Fiborblast Büyüme faktörü reseptörü 3
FLC	serbest hafif zincir
GTP	Guanozin trifosfat
HIF1	Hipoksi ile indüklenbilir fakör 1
HIF2a	Hipoksi ile indüklenbilir fakör 1
IFE	İmmünoфикsasyon
IFN	interferon

Ig	İmmünoglobulin
IMWG	Uluslararası Miyelom Çalışma Grubu
ISS	Uluslararası Evreleme Sistemi
KDEL	Lizin-Aspartik asit-Glutamik asit-Lösün
KDELRL1	KDEL reseptör 1
LPL/WM	Lenfoplazmasitik lenfoma/Waldenström makroglobulinemisi
µl	mikrolitre
LDH	laktat dehidrojenaz
NDMM	Yeni tanı almış multipl miyelom
NT	Nontargeting (Hedefsiz)
NTC	Non transfected cells (Transfekte edilmeyen hücreler)
MCL-1	İndüklenmiş miyeloid lösemi hücre farklılaşma proteini 1
MGUS	Önemi Bilinmeyen Monoklonal Gamopati
MM	Multipl Miyelom
MMSET	Multipl Miyelom SET domaini
mRNA	mesajcı RNA
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide
NFKB	nükleer faktör kappa B alt birimi 1
nm	nanometre
OUA	Obstruktif uyku apnesi
PBS	Phosphate buffered saline
PCL	Plazma Hücreli Lösemi
PET/BT	Pozitron Emisyon Tomografisi/ Bilgisayarlı Tomografi
pmol	pikomol
POEMS	Polinöropati, Organomegali, Endokrinopati, Monoklonal protein ve Deri Değişimi
qRT-PZR	kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RB1	Retinoblastoma proteini
RNA	Ribonükleik asit
RNAi	RNA interferans
RISC	RNA-induced silencing complex
siRNA	small interfering RNA
SNP	Tek nükleotit değişimi

SMM	Smoldering Multipl Miyelom
SPEP	Serum Protein Elektroforezi
TP53	Tümör protein 53
TBP	TATA bağlayıcı protein
UPEP	İdrar Protein Elektroforezi
WB-CT	Tam kan pıhtılaşma testi
XPO1	exportin-1



ÖZET

Punar Ş. KDELR1 ve COPE Genlerinin Multipl Miyelom Patogenezindeki Rolü. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2022.

Multipl miyelom, terminal olarak farklılaşmış plazma hücrelerinin malignitesidir. Hematolojik maligniteler arasında ikinci sırada yer almaktadır. Kemik iliğinde kontrolsüz monoklonal plazma hücrelerinin çoğalması, hücrelerde fonksiyonel olmayan immünoglobulinlerin veya immünoglobulin zincirlerinin aşırı üretilerek birikmesi ile karakterizedir. Önceki çalışmalarımızda KDELR1 ve COPE genlerinin anlatımının hastalarda arttığını gösterdik. Bu genler endoplazmik retikulum ve golgi arasında proteinlerin taşınmasında rol alan genlerdir. KDELR1 bir reseptördür ve ilgili diziye sahip proteinlerin bağlanmasını sağlar. Proteinlerin COPI aracılı retrograd taşınması için COPI veziküllerine paketlenmesinde rol oynar. COPE geni COPI yapısına katılan epsilon alt birimidir. Çalışmamızda, KDELR1'in multipl miyelomdaki etkisini anlamak için U266 ve RPMI8226 hücrelerindeki gen ifadesi siRNA aracılığı baskılandı. Kontrol grubu ve KDELR1 siRNA uygulanan gruplarda apoptoz tayini için konfokal lazer taramalı mikroskopta floresan boya ile boyanan hücreler görüntülendi. Hücre proliferasyonuna olan etkiyi belirlemek için MTT testi yapıldı. KDELR1 geninin baskılanmasının COPE geni üzerindeki etkisi qRT-PZR yöntemi ile belirlendi. Tüm deney grubu çalışmaları 24 ve 48 saat zaman diliminde gerçekleştirildi. KDELR1 geni baskılanmış U266 hücrelerinde 24 saat diliminde COPE gen anlatımının kontrol grubuna göre arttığı bulunurken RPMI8226 hücrelerinde değişim bulunmadı. Apoptotik hücre oranının her iki hücrede de kontrol grubuna kıyasla siRNA grubunda arttığı bulundu. Hücre canlılığı da özellikle 24 saat diliminde her iki hücre hattında azaldığı belirlendi. KDELR1 geninin baskılanmasının hücre canlılığını azalttığı ve apoptozu tetiklediği gösterildi. Bu çalışma U266 ve RPMI8226 hücrelerinde KDELR1 geni ile yapılan ilk fonksiyonel çalışma özelliğine sahiptir.

Anahtar Kelimeler: Multipl miyelom, KDELR1, COPE, siRNA

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37570

ABSTRACT

Punar Ş. The Role of KDELR1 and COPE Genes in Multiple Myeloma Pathogenesis. İstanbul University, Institute of Health Science, Genetics Department. Master Thesis. İstanbul. 2022.

Multiple myeloma is the malignancy of terminally differentiated of plasma cells. It is taken place secondly within the hematological malignancy and characterized as proliferation of uncontrolled monoclonal plasma cells in bone marrow, accumulation of nonfunctional immunoglobins. In our previous experiment, we showed KDELR1 and COPE gene expression is increased in patients. Those are the genes taking place in transportation of protein between endoplasmic reticulum and golgi apparatus. KDELR1 makes the proteins with KDEL sequence bind. It plays role in packaging proteins into COPI vesicles to transport as retrograde. COPE gene is the epsilon subunit of COPI complex. In our experiment, KDELR1 expression was silenced in U266 and RPMI8226 cell lines to identify the role of its expression. Cells were scanned in confocal microscope to detect the apoptosis effects in control and KDELR1 siRNA applied groups. MTT test was applied to detect the effect of KDELR1 on cell proliferation. The effect of suppressed KDELR1 on COPE gene was identified by qRT-PCR. All experimental groups were studied during 24 and 48 hours. COPE gene expression difference was compared with the control. Although COPE gene expression in U266 was found dramatically increased in the 24th hour, any change wasn't observed in RPMI8226 cells. Apoptotic cell ratio in cells was found increased when compared with controls. Proliferation was decreased in both cells during 24th hours. Decreased cell proliferation effect was observed when KDELR1 was suppressed. This experiment is the first study showed the function of KDELR1 in the U266 and RPMI8226 cell lines.

Key Words: Multiple myeloma, KDELR1, COPE, siRNA

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 37570

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Plazma hücre diskrazileri, klinik ve biyolojik heterojeniteye sahip hematolojik hastalıklar grubu olarak tanımlanmaktadır. MGUS ve MM plazma hücre diskrazileri arasında yer almaktadır. MGUS, serum M protein miktarının 3 g/dl'den az olması ve kemik iliğinde %10'dan daha az plazma hücre varlığı ile karakterizedir. SMM de MGUS ve MM arasında bir ara form olup asemptomatiktir.

MM hücrelerde immünoglobulinlerin birikmesi ve kemik iliğinde anormal monoklonal plazma hücre varlığı ile karakterizedir. MM'de, plazma hücre bozukluğundan kaynaklanan hiperkalsemi, böbrek yetmezliği, anemi ve kemik lezyonları (CRAB) görülmektedir. MM, tüm kanserlerin yaklaşık olarak %1'ini ve hematolojik kanserlerin ise %10'unu oluşturmaktadır. Erkeklerin kadınlara göre hastalıktan daha fazla etkilendiği bilinmektedir. Hastaların tanıdaki yaşı, ortalama 66-70 yaş aralığında görülmektedir. İlaç tedavisi çoğunlukla proteozom inhibitörleri, immünomodülatör ilaçları ve monoklonal antikorları kapsamaktadır. Son yıllarda tedavideki önemli ilerlemelere rağmen yılda yaklaşık %10-15 oranında sağkalım olduğu bildirilmiştir.

MM genetik olarak son derece karmaşık ve heterojendir. Kromozomal translokasyonlar ve trizomiler başlangıçta görülen birincil değişimlerdir. Trizomiler genellikle 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 ve 21 gibi tek sayılı kromozomlarda görülmektedir. Anormal plazma hücrelerinin büyüme potansiyelini arttıran sekonder genetik değişiklikler gerçekleşir. Kopya sayısı anomalileri, DNA hipometilasyonu, tek nükleotit değişimleri bu değişimler arasında yer almaktadır. MM patogenezinde kemik iliği nişi dâhil olmak üzere çok fazla gen ve yolak rol oynamaktadır.

Endoplazmik retikulum (ER) lümenindeki yerleşik proteinler Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) reseptörleri ile etkileşime giren karboksi terminal ER tutma dizileri (ERS'ler) tarafından homeostatik koşullar altında ER içinde tutulur. KDELR1, KDELR2, KDELR3 olmak üzere 3 KDEL reseptörü vardır. KDELR1 geninin kodladığı reseptör cis-Golgide yer almaktadır ve KDEL motifi içeren proteinleri tanır. KDEL dizisi içeren ER lokalize olan göze çarpan proteinler arasında BiP/Grp78, Grp94 ve PDI yer almaktadır.

KDELRL1 geninin kodladığı reseptör, proteinlerin COPI aracılı taşıma ile ER'ye retrograd taşınmasına aracılık eder. COP1 kompleksi yedi alt birimden (α -, β -, β' -, γ -, δ -, ϵ - ve ζ -) oluşmaktadır. COPE geni bu kompleksin epsilon alt birimini kodlamaktadır. KDELRL1 ve COPE genlerinin ER ve golgi arası protein taşınmasında önemli rolleri vardır.

Önceki çalışmamızda MM hastalarının transkriptom datasından elde ettiğimiz genleri MM hastaları ve sağlıklı kontroller arasında qRT-PZR yöntemi ile karşılaştırıldı. Yeni tanı almış ve tedavi olmamış MM ve MGUS hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla COPE ve KDELRL1 genlerinin anlatım seviyelerinin daha yüksek olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulundu. MM'de bozulan protein homeostazı sebebiyle bu genlerin patogeneizde rol oynadığını düşünmekteyiz. Bundan dolayı bu tez çalışmasında hasta örnekleri ile konfirmasyonu yapılan genlerin fonksiyonel olarak araştırılmasını amaçladık. Amacımız; MM hücre hattı olan U266 ve RPMI8226 hücrelerinde siRNA aracılı KDELRL1 gen ifadesi baskılanarak hücre proliferasyonu, apoptozuna ve COPE genine olan etkisini incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Plazma Hücre Diskrazileri

Kemik iliğinde ve sekonder lenfoid organlardaki hematopoetik kök hücrelerden B hücreleri gelişmektedir. Plazma hücreleri ise B-hücrelerinin terminal olarak farklılaşması sonucu oluşmaktadır. Bu hücreler farklı ağır ve hafif zincir özelliklerinde antikor üretilip salgılayabilme yeteneğine sahiptir (1). Normal plazma hücreleri, farklı hafif zincir (kappa ve lambda) ve ağır zincir (IgE, IgG, IgM, IgD ve IgA) özelliklerine sahip antikor spektrumu içermektedir. İmmün sistemdeki bilinen kritik rolleri dışında, plazma hücreleri hastalıklarda da rol oynamaktadır (2).

Plazma hücre diskrazileri, klinik ve biyolojik heterojeniteye sahip hematolojik hastalıklar grubu olarak tanımlanmaktadır (3). Monoklonal plazma hücre artışı ile karakterize olan bu hastalık grubu, serum ve idrar protein elektroforezi (SPEP, UPEP) ve immünfiksasyon (IFE) çalışmaları ile belirlenmektedir (4). Paraprotein veya M proteini olarak adlandırılan monoklonal ağır veya hafif zincir antikorun varlığı erken döneminde hastalığın yaygın olan bulgusudur. Genellikle herhangi bir ilgili klinik semptom fark edilmeden önce ortaya çıkmaktadır (2). Bu hastalık grubu içerisinde; önemi bilinmeyen monoklonal gamopati (MGUS), multipl miyelom (MM), plazma hücreli lösemi (PCL), lenfoplazmasitik lenfoma/Waldenström makroglobulinemisi (LPL/WM), amiloidoz ve POEMS (Polinöropati, Organomegali, Endokrinopati, Monoklonal protein ve Deri değişiklikleri) sendromu yer almaktadır (4).

2.1.1. Önemi Bilinmeyen Monoklonal Gamopati (MGUS)

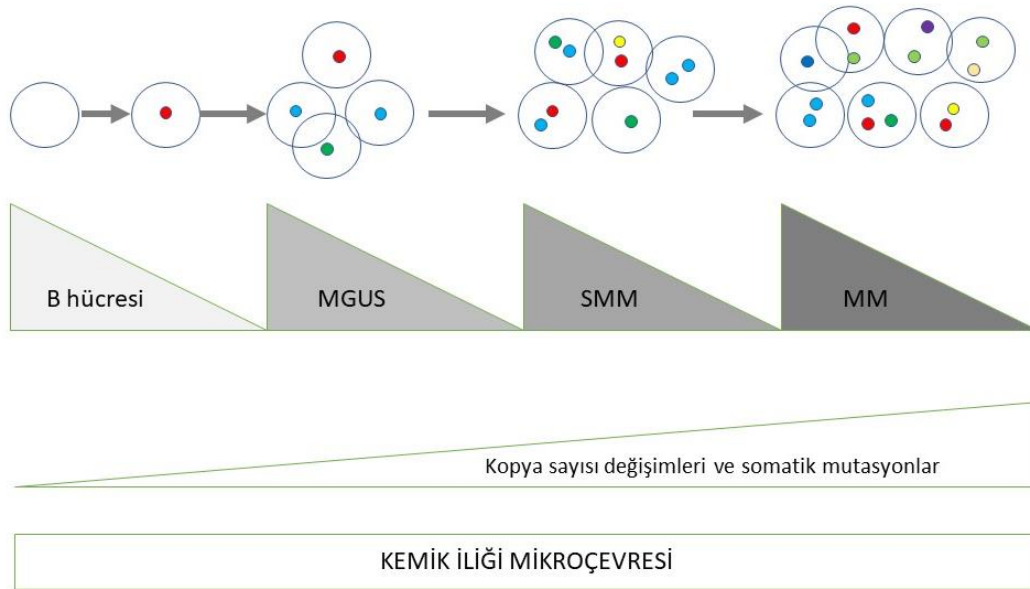
MGUS terimi 1978'de, Kyle ve Greipp tarafından tanımlanmıştır (5). 2014 yılında, Uluslararası Miyelom Çalışma Grubu (IMWG), hem MGUS hem de Smoldering Multiple Myeloma (SMM) tanımını etkileyen MM tanımını güncellemiştir (6). MGUS, genel olarak serum M proteini 3 g/dL'den az olan ve kemik iliğinde %10'dan az plazma hücrelerinin varlığı ile karakterize olarak tanımlanmaktadır. Plazma hücre bozukluğundan kaynaklanan hiperkalsemi, böbrek yetmezliği, anemi ve kemik lezyonları (CRAB) MGUS'ta görülmemektedir (7).

MGUS hastalığının ara formudur, her yıl bu hastalık grubunun %1'lik kısmı MM, lenfoproliferatif bozukluk, amiloidoz veya hafif zincir birikimi hastalığına dönüşmektedir. MGUS'taki en yaygın ağır zincir alt tipi, hastaların %70'inde bulunan IgG'dir. Bu oranı %15 ile IgM, %12 ile IgA ve %3 ile biklonal gammopati takip etmektedir. MGUS kendi içinde, IgM temel alınarak sınıflandırılma yapılmaktadır. Bu sınıflandırma IgM olmayan MGUS, IgM MGUS ve hafif zincir MGUS olarak 3 grubu kapsamaktadır. Özellikle IgM MGUS'lu hastalardan, non-Hodgkin lenfoma, kronik lenfositik lösemi, hafif zincirli amiloidoz ve WM gelişme riski yılda %1,5 oranında artmaktadır. Hafif zincir MGUS, ilgili hafif zincirin (FLC) serum değerinin artması sonucunda anormal FLC oranı ile karakterizedir. Kemik iliğindeki klonal plazma hücrelerinin %10'dan az olması ve serum ve idrarda monoklonal immünoglobulin ağır zincirinin varlığının olmaması olarak tanımlanmaktadır (8). (Tablo2-1)

2.1.2. Smoldering Multipl Miyelom (SMM)

SMM, asemptomatik bir klonal plazma hücresi bozukluğudur. MGUS'tan serum M protein düzeyi ve kemik iliğindeki klonal plazma hücrelerinin yüzdesi temelinde ayırt edilmektedir. SMM asemptomatik olduğundan, yeni teşhis edilen hastalara çeşitli bozuklukların incelenmesinin yanı sıra laboratuvar testlerinde bir M proteini bulgusu ile teşhis koyulmaktadır (9). SMM serum M proteininin 3 g/dL ve fazla olması ve/veya %10-60 oranında kemik iliğinde plazma hücrelerinin bulunması ile karakterizedir. Hafif zincir SMM, immünoglobulin ağır zincir ekspresyonu olmayan monoklonal FLC seviyesinin fazla olduğu SMM'nin alt tipidir. Bu alt tip, idrarda monoklonal FLC'nin aşırı salgılanması ile karakterize edilir. MGUS'ta olduğu gibi SMM, CRAB semptomları veya başka herhangi bir miyelomla ilişkili semptom içermemektedir. MGUS insidansı SMM'den daha yüksektir ve 50 yaş üstü nüfusun yaklaşık %3-4'ünde mevcuttur (7). SMM vakalarının yılda yaklaşık %40 MM'ye dönüşme riski vardır. SMM tanısında tipik yaş; 50 ila 70 yıl olarak kabul edilmektedir (9).

MM, MGUS ve SMM'ye göre oldukça karmaşık ve heterojen genomik yapıya sahiptir. MM ilerlemesinin ana sebepleri olan kromotripsis, kromopleksi vb. sonucunda ortaya çıkan translokasyonları, kopya sayısı anomallikleri tam olarak tanımlanamamıştır. Yapılan sitogenetik çalışmalar, trizomilerin ve/veya IGH kromozomal translokasyonlarının, normal plazma hücrelerinin MGUS'a dönüşümünün altında yatan ana miyelom başlatan olaylar olduğunu göstermektedir. Bu olaylardan sonra MGUS/SMM'den MM'ye ilerlemeye katkıda bulunan ikincil sitogenetik değişimler gerçekleşmektedir. Değişimler, MM ile karşılaştırıldığında MGUS/SMM'de daha düşük prevalanstadır. Bu durum MGUS/SMM'nin MM'ye ilerlemesine katkıda bulunduğunu destekler niteliktedir (10).



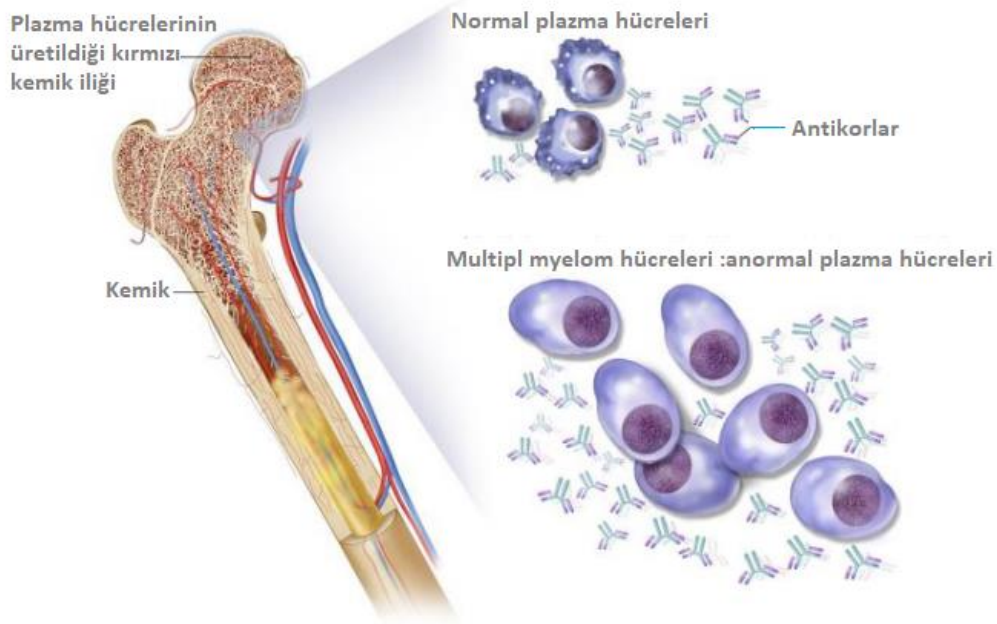
Şekil 2-1: MM oluşumu ve ilerlemesi (11)

2.2. Multipl Miyelom (MM)

Olgunlaşmamış B hücreleri kemik iliğinde, yeniden düzenlenerek çeşitli birincil immüoglobulinleri oluşturmaktadır. Hücre yüzeyinde *IgH-IgL* kompleksi bulunan B hücreleri, lenf düğümü veya dalak gibi sekonder lenfoid organlara göç eder. Burada, B hücreleri, afinite olgunlaşması, somatik hipermutasyon ve *class-switching* rekombinasyonu gibi çeşitli işlemlerden geçer. Bu işlemler spesifik antijenler için yüksek afiniteye ve farklı fonksiyonel özelliklere sahip antikörlerin üretilmesiyle sonuçlanır. Sonuçta hematopoetik hücreler kemik iliğinde ve sekonder lenfoid organlarda önce B hücrelerine sonra bir takım değişikliklerle farklılaşarak plazma hücresine dönüşürler (12).

MM, plazma hücrelerinin heterojen bir hastalığıdır. Kemik iliğinde kontrolsüz monoklonal plazma hücrelerinin büyümesi ile karakterizedir. Hücrelerde, fonksiyonel olmayan immüoglobulinlerin veya immüoglobulin zincirlerinin aşırı üretimi gerçekleşir. İmmüoglobulinlerin birikmesi ve anormal monoklonal plazma hücrelerinin kemik iliğindeki diğer hücrelerle etkileşimi, anemi, kemik lezyonları, enfeksiyonlar, hiperkalsemi, böbrek yetmezliği, yorgunluk ve ağrı gibi bir dizi soruna yol açar (13).

MM genetik olarak son derece karmaşık hastalıktır önce immüoglobulin ağır zincir genlerindeki değişiklikler kromozomal tranlokasyonlar oluşur. Daha sonra kopya sayısı anomalileri, DNA hipometilasyonu ve kazanılmış mutasyonlar gibi ikincil genetik olaylar ile tümör oluşur (14). Ayrıca, *Class-switching* rekombinasyonu ve somatik hipermutasyon için immüoglobulin lokuslarındaki çift iplikli DNA kırılmaları da bu oluşuma katkı sağlar. DNA kırılmaları, genomun başka yerlerinde meydana gelen diğer kırılmalarla birleşerek anormal DNA füzyonlarına ve kromozomal translokasyonlara sebep olabilir. Spesifik onkogenleri içeren translokasyonlar, hücrelerde patolojik durumların gelişmesine yol açabilir. Bu nedenle, kromozomal translokasyonlar, MM vakalarının oluşumunu başlangıcında daha sonraki değişimleri de tetiklediği için son derece önemlidir (12). (Şekil 2-2)



Şekil 2-2: Kemik iliğinde plazma hücrelerinden MM hücrelerinin oluşumu (15)

2.2.1. Epidemiyoloji

MM, tüm kanserlerin %1'ini ve hematolojik malignitelerin yaklaşık olarak %10'unu oluşturmaktadır. Lenfomadan sonra görülen en yaygın 2. hematolojik malignitedir (16). MM vakalarında siyah ırkın beyaz ırka oranla iki kat daha fazla etkilendiği belirtilmiştir. Doğumdan 74 yaşına kadar cinsiyet temelinde bakıldığında, tanı alma riski erkeklerde %0,24 ve kadınlarda %0,17'dir. Bu durumda erkeklerin kadınlara göre hastalıktan daha fazla etkilendiği görülmektedir. Avustralya, Batı Avrupa ve ABD'de yüksek insidans ile daha yaygındır ve görülme sıklığı giderek artmaktadır. ABD'de, 2020 yılında teşhis edilen kanser vakalarının %1,8'nin (yaklaşık 32.000 kişi) MM olduğu bildirilmiştir. Bu durum, multipl miyelomu en yaygın 14. neoplazm yapmaktadır. Mevcut verilere bakıldığında tahmini insidans oranında 1975'ten bu yana %143'lük bir artış olmuştur (17, 18). Dünya çapında 5 yıllık prevalans yaklaşık 230.000 hastadır. Batı dünyasında yaşa göre standardize edilmiş insidansın yaklaşık 100.000'de 5 vaka olduğu bildirilmiştir.

Hastaların tanıdaki ortalama yaşı yaklaşık 66-70'tir ve bu hastaların %37'si 65 yaşın altındadır. MM, 30 yaşın altındaki kişilerde çok nadir görülmektedir ve bildirilen sıklık %0.02 ila %0.3 arasındadır (16). Son 20 yılda hastaların sağ kalımında önemli iyileşme olmasına rağmen, genel popülasyonla karşılaştırıldığında hastaların sadece %10-15'inde sağ kalım görülmektedir (19).

2.2.2. MM GENETİK DEĞİŞİMLERİ

2.2.2.1. Primer Genetik Değişimler

Normal plazma hücrelerinden MGUS oluşumuna neden olan ilk dönüşümün moleküler temeli tam olarak aydınlatılamamıştır. Sitogenetik tekniklerin özellikle FISH yönteminin gelişmesi ile, MM'deki primer genetik anormallikler (translokasyonları ve trizomiler) tespit edilmektedir. Her biri hastaların yaklaşık %40'ında ortak olarak görülmektedir. Trizomiler genelde tek sayılı 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 ve/veya 21 numaralı kromozomları içermektedir. Bu durum hiperdiploid karyotipe yol açmaktadır. Tek sayı kromozomlarının olması rastgele değildir fakat bu durumun temeli bilinmemektedir (20).Yapılan bir çalışmada, trizomi 3 veya trizomi 5'in önemli ölçüde daha iyi genel sağkalımla ilişkilendirilirken, trizomi 21 daha kötü sonuçlarla ilişkilendirilmiştir (14). MM'de %90 üzerinde görülen birincil translokasyonlar genellikle kromozom 14 (14q32.33) üzerindeki IgH gen lokusunu içermektedir ve %90 üzerinde görülmektedir. Translokasyonlar 4, 6, 11, 14 ve 20 numaralı kromozomlar arasında gerçekleşmektedir. Bu translokasyonlar, MGUS veya miyelomun tüm aşamalarında mevcut olan klonal değişikliklerdir. Yani, tüm tümör hücrelerinde bulunmaktadır. Kromozom 12 ve 8 ise daha az yaygın olarak görülmektedir (13, 14).

Yapılan çalışmalar sonucu siklin D proteinleri ailesinin (siklin D1, D2 ve D3) düzensizliklerin, hastalığın çok erken aşamalarda mevcut olduğu gösterilmiştir. Bu genetik düzensizliği açıklayan birden fazla mekanizma bulunmaktadır. Bunlar; *CCND1* (siklin D1) ve *CCND3*'ün (siklin D3) IgH geni ile translokasyonu, spesifik siklin D gen amplifikasyonları, trizomiler ve henüz karakterize edilmemiş diğer sitogenetik olaylar olarak özetlenmektedir (20).

Siklin D ekspresyonunun regülasyonunun artışı, anormal bir plazma hücrelerinin oluşumunda erken dönemde gerekli olsa da MGUS'tan MM'ye dönüşüm için tek başına yeterli değildir. En sık görülen iki translokasyon partnerleri, siklin D1 genini doğrudan hedefleyen ve yukarı regüle eden 11q13 bölgesi, ardından hem *FGFR3* hem de *MMSET* genlerini hedefleyen ve siklin D2'nin düzensizliğine yol açan 4p16 bölgesidir. Sırasıyla 16q23 ve 20q11'de bulunan ve siklin D2'nin aşırı ekspresyonuna yol açan *MAF* ve *MAFB* transkripsiyon faktörlerini içermektedir. 6p21 lokusundaki değişimler, o bölgede bulunan siklin D3 geninin (*CCND3*) aşırı ekspresyonuna yol açar (20). (Şekil 2-3)

2.2.2.2. Sekonder Genetik Değişimler

Bir veya daha fazla siklin proteininin düzensizliğini takiben, anormal plazma hücrelerinin büyüme potansiyelini arttırmak için ek genetik değişiklikler meydana gelmektedir. Aktive edici mutasyonlar MM'ye kıyasla MGUS'ta çok daha düşük seviyelerdedir. Hastalığın seyrinde, ilerleyen dönemlerde meydana gelir ve genellikle kötü bir prognoz ile ilişkilidir (20). Sekonder genetik olaylar, kromozomal translokasyonları, kopya sayısı varyasyonlarını (CNV) ve tek nükleotid varyantlarını (SNP) kapsamaktadır.

MM'de hastaların %35-40'ında kromozom 13 monozomisi ve % 6-10'unda ise 13q delesyonu en yaygın olarak görülen sekonder genetik olaylardandır (14). Kromozom 13'ün uzun kolunun kaybı (del(13q)), yeni tanı almış MM (NDMM)'nin neredeyse %50'sinde meydana gelmektedir ve klonaldır. Ancak MGUS'ta görülme oranı daha az sıklıktadır. Kromozom 13'teki bu delesyon, t(4;14) ve t(14;16) ile birlikte ortaya çıkar ve kötü prognozun belirteci olarak bilinmektedir. Böyle durumlarda tedavide proteozom inhibitörleri kullanılmaktadır. Miyelom patogenezinde katkıda bulunan birkaç lokus 13q bölgesinde yer almaktadır. Genellikle 13q kolunun tümü delesyona uğrar ve bu durum hastalık patogenezinin etkilemektedir. 13q14 bölgesine *RB1* geni lokalizedir. *RB1* *E2F* transkripsiyon faktörlerini ayırarak hücre döngüsü ilerlemesini önler ve kaybı durumunda kontrolsüz büyüme ve bölünme ile sonuçlanır. Bölgenin kaybı mono-aleliktir ve nadiren bialelik *RB1* inaktivasyonu ile sonuçlanan mutasyonlar veya delesyonlar içermektedir (13).

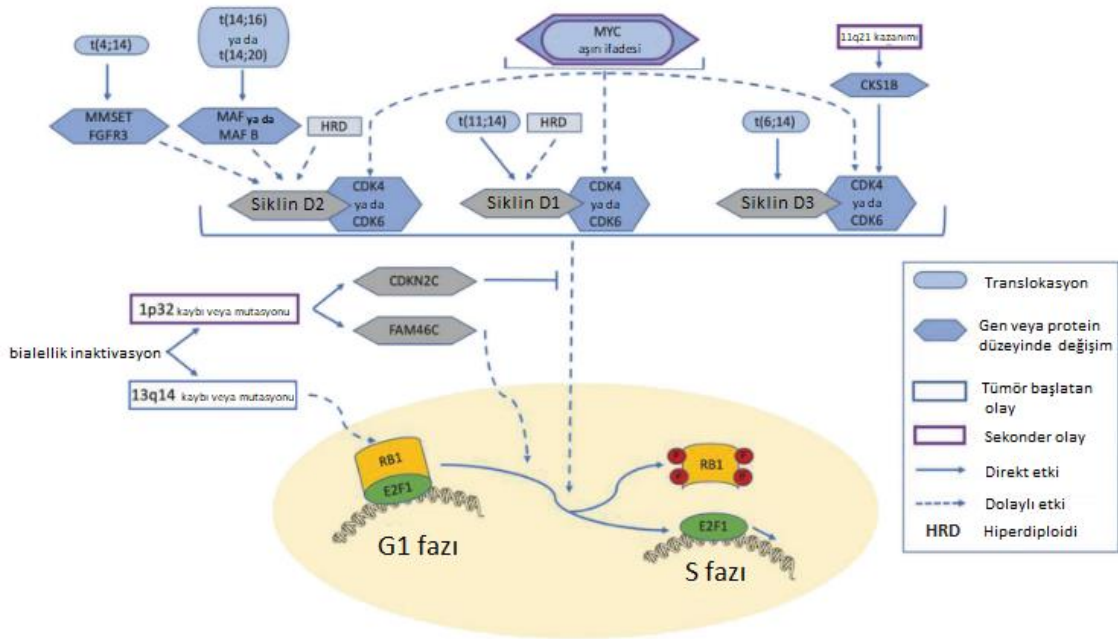
Kromozom 1'in uzun kolunun amplifikasyonu (amp(1q)) hastaların %40'ında görülür ve daha kötü prognoz ile ilişkilidir. Kötü prognoza sahip, 4 veya daha fazla kromozom 1q kopyasına sahip hastaların üç kopya olanlara göre daha kötü tabloya sahip olması bu durumun doza bağımlı olduğunu göstermektedir. Bu bölgede yer alan genlerin ekspresyonu, MM üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Kromozom 1q amplifikasyonlarının yaklaşık üçte ikisi, del(13q) ile birlikte görülmektedir. Yüksek riskli miyelomdaki gen imzası çok sayıda 1q genini kapsamaktadır. Örneğin, sikline bağımlı kinaz inhibitörü olan *CDKN1B*'nin (*p27KIP1*) ubiquitinasyonunu ve bozulmasını kolaylaştıran *CKS1B*'yi içermektedir (13).

Kromozom 1q üzerindeki bir başka gen, plazma hücresi farklılaşması sırasında indüklenen ve plazma hücresi ve miyelom hücresinin hayatta kalması için gerekli olan bir *BCL2*-ailesi anti-apoptotik protein olan *MCL1*'dir. Son zamanlarda yapılan erken faz klinik deneylerinde *MCL1* inhibitörleri kullanılmaktadır. Bunların, *MCL1*'i aşırı eksprese eden miyelomaya karşı daha etkili olup olmadığı yapılan çalışmalar sonucu ortaya çıkacaktır (13). Kromozom 1'in kısa kolunun delesyonu (del(1p)) hastaların %20-25'inde görülür ve sıklıkla hipodiploidi ile birlikte ortaya çıkar. Hiperdiploididen farklı olarak, hipodiploidi del(1p) gibi daha kötü prognoz ile ilişkilidir. Kromozom 1p'de kaybolan bölge sıklıkla sikline bağımlı kinaz inhibitörü *CDKN2C*'yi içerir ve amp(1q)'ye benzer şekilde, del(1p)'nin üçte ikisi de del(13q) ve *RB1*'in monoalelik kaybı ile bir arada görülmektedir (13).

Kromozom 1p üzerinde yer alan miyelom baskılayıcı gen, kanonik olmayan (*non-canonical*) bir poli(A) polimeraz olan *FAM46C*'dir. *FAM46C*'deki inaktive edici mutasyonlar, hücrenin hayatta kalma avantajı kazanması ile sonuçlanmaktadır. Tam tersi şekilde genin aşırı ekspresyon, katlanmamış protein yanıtına ve hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu gen del(1p) sonucunda NDMM'nin yaklaşık %25'inde kaybolmaktadır. Ayrıca *FAM46C*, NDMM'nin yaklaşık %2,5'inde mutasyona uğramaktadır ve bu da MM'de tümör baskılayıcı olarak rolünü desteklemektedir (13).

İkincil genetik değişimler arasında; kromozom 1'in kopya sayısı değişiklikleri (uzun kolun kazanımı ve/veya kısa kolun kaybı) ve 8q24 lokusunda *cMyc* aktive edici yeniden düzenlemeleri yer almaktadır. MM'de kromozom 17'nin kısa kolunun delesyonu ya da inaktive edici mutasyonlar nedeniyle *TP53* aktivitesi kaybolur ve kötü prognozla sonuçlanır (20).

NFκB transkripsiyon faktörü yolağının düzenlenmesini inaktive eden mutasyonlar, hastalığın geç evresinde yaygın olarak görülmektedir. *NFκB*, MM hücrelerinin kemik iliği stroması ile etkileşiminde yer alan adezyon moleküllerinin ekspresyonunu düzenlemektedir. Düzenleyici kontrolün kaybı sonrasında MM-stromal ilişkisi, hem MM hücrelerinin ekstrasmedüller büyümesine hem de stromal bağımsız PCL gelişimine katkıda bulunur (20). (Şekil 2-3)



Şekil 2-3: MM'de primer ve sekonder genetik değişimler (21)

2.2.3. MM ve Kemik İliği Mikroçevresi

Kemik iliği mikroçevresi, oluşabilecek hasarı yenileyebilen, inflamatuvar araçlara ve endokrin sinyallere yanıt verebilen oldukça dinamik bir niştir. Hem malign transformasyonun hem de MM hastalığının ilerlemesinin birincil düzenleyicileri arasında yer almaktadır. Kemik iliği mikroçevresi sitokinler, kemokinler, adipokinler, makrofajlar, nötrofiller ve kemik iliğindeki diğer hücreler tarafından salgılanan büyüme faktörleri (ör. *IL-6*, *IGF-1*, *VEGF*, *TNF- α* ve *SDF-1*) dahil aktif inflamatuvar ajanlarıda kapsamaktadır. Bu faktörler sonrasında habis hücre büyümesini, ilaç direncini ve sağlıklı hücrelerin sitotoksitesini etkilemektedir (22). Tipik bir MM tümör mikro ortamı, MM mezenkimal stromal hücreler, osteoblast ve osteoklast kemik hücreleri, kemik iliği adipositleri ve çeşitli immünomodülatör hücre tipleri (örn., makrofajlar, NK hücreleri, düzenleyici T hücreleri vb.) dahil olmak üzere birkaç hücre alt tipi içermektedir. Hipoksik mikro ortam, kemik iliği içindeki hücreler için genomik kararsızlığı daha da artırabilir, ayrıca MM hücrelerinin ilaç direncine katkıda bulunabilir. Hipoksinin MM üzerindeki etkileri araştırılmaya devam etmektedir (22).

Kemokin *CXCL12*, *CXCR4* kemokin reseptörünü bağlar ve hematopoetik kök hücrelerin kemik iliği mikroçevresinde tutulması için çok önemlidir. *CXCR4* ve ligandı *CXCL12*, hem stromal hem de plazma hücreleri tarafından eksprese edilir. Multipl miyelomlu hastalardan alınan kemik iliği endotel hücrelerinde *CXCL12* ekspresyon seviyesi yüksek olduğu bildirilmiştir. Sağlıklı hematopoetik kök hücrelerin aksine, *CXCL12* miyelomun malign plazma hücrelerinin proliferasyonunu uyarmaktadır. Bu mekanizmanın miyelom hücreleri tarafından ortak olduğu ve hücrel yapışmayı ve ilaç direncini artırmak için manipüle edildiği ve hatta ekstramedüller hastalığa katkıda bulunduğu görülmektedir (23).

Miyelom hücreleri, MGUS'tan MM'ye ilerleme sırasında, hipoksik koşullarda *HIF1* ve *HIF-2 α* ekspresyonu artar bunun sonucunda anjiyogenez uyarılır. Bu koşullar, kemik iliğinin yeni bölgelerine yerleşmeye yardımcı olan *CXCR4*'ün MM hücrelerinde ekspresyonunun artması sonucu dolaşım yoluyla miyelomun yayılmasını sağlayabilir (23).

Hipoksik endosteal kemik iliği nişi, sadece *HIF-2a* ekspresyonunu değil, aynı zamanda miyelom hücrelerinde *CXCL12* ekspresyonunu da indükler. Bu gözlemler, stromanın hem vasküler hem de endosteal nişleri etkileyen kemik iliği mikroçevresindeki değişikliklere sebep olur (23). Tümör mikroçevresi; MM'nin ilerlemesinde son derece önemli olup, büyüme, çoğalma, yapışma ve göç gibi birçok biyokimyasal değişimlerin gerçekleşmesini sağlamaktadır (22).

2.2.4. MM TANI

Hastaların çoğu, organ hasarının belirti ve semptomlarına sahip olsa da, hastalık rutin kan testlerinde M-proteini tespiti tanıda son derece önemlidir. MM ve asemptomatik öncü durumları ayırt etmek için hastaların ayrıntılı klinik, biyokimyasal ve radyolojik kriterlerinin araştırması gereklidir (24). MM tanısı, kemik iliği muayenesinde %10'dan fazla klonal plazma hücresi veya plazmasitom varlığına ek olarak bir veya daha fazla miyelom ile ilişkili semptomun varlığını gerektirir. Klinik olarak multipl miyelomdan şüphelenildiğinde, hastalar serum ve idrarda M proteinine ve serumdaki FLC oranına bakılmaktadır (25). 2014 yılında Uluslararası Miyelom Çalışma Grubu (IMWG) tarafından MM tanı kriterleri güncellenmiştir ve Tablo 2-1'de özetlenmiştir. Sitogenetik olarak, t(11;14), t(4;14), t(14;16), t(6;14), t(14;20), trizomiler ve del(17p)'ye özgü probler kullanarak FISH yöntemiyle tanı konmaktadır. Kemik hastalığının kapsamı en iyi düşük doz WB-CT veya PET/BT görüntüleme ile değerlendirilmektedir (25). Hastaların %80'inden fazlasını oluşturan moleküler sitogenetik anlamda MM dört ana alt tipi vardır. Bunlar trizomik MM, t(11;14) MM, t(4;14) MM ve MAF MM olarak adlandırılan t(14;16) veya t(14;20) translokasyonlu MM'yi içermektedir (26).

Tablo 2-1: Uluslararası Miyelom Çalışma Grubu Tanı kriterleri (27)

Hastalık İsmi	Tanımı
Non-IgM MGUS	3 kriter birlikte olmalıdır: - Serum monoklonal antikor (IgM olmayan) seviyesinin 3 g/dl'den az olması - Kemik iliğinde klonal plazma hücrelerinin %10'dan az olması - Plazma hücresi proliferatif bozukluğuna atfedilebilecek CRAB semptomları gibi son organ hasarının olmaması
IgM MGUS	3 kriter birlikte olmalıdır: - Serum IgM monoklonal protein seviyesinin 3 g/dL'den az olması - Kemik iliğinde lenfoplazmasitik infiltrasyonun %10'dan az olması - Altta yatan lenfoproliferatif bozuklukla ilişkili anemi, yapısal semptomlar, hiperviskozite, lenfadenopati veya hepatosplenomegali olmaması
Hafif zincir-MGUS	Tüm kriterler birlikte olmalıdır: - Anormal FLC oranı (0,26'den az veya 1,65'ten fazla olması) - İlgili hafif zincir seviyesinde artış olması - İmmünfiksasyonda immünoglobulin ağır zincir ekspresyonu olmaması - Plazma hücresi proliferatif bozukluğu ile ilişkili uç organ hasarının olmaması - Kemik iliğinde klonal plazma hücrelerinin %10'dan az olması

	İdrar monoklonal protein seviyesinin 500 mg/24 saat'den az olması
SMM	Tüm kriterler birlikte olmalıdır: - Serum monoklonal proteinin 3 g/dL'den fazla olması veya her 24 saatte idrar monoklonal proteini 500 mg'den fazla olması - Kemik iliğinde klonal plazma hücrelerinin %10-60 oranında olması - Miyelom tanımlayan olayların veya amiloidozun olmaması
MM	Her iki kriter de karşılanmalıdır: - Kemik iliğinde klonal plazma hücrelerinin %10'dan fazla olması veya biyopsi ile kanıtlanmış kemik veya ekstramedüller plazmasitoma - Aşağıdaki miyelom tanımlayan olaylardan herhangi biri veya birden fazlasının olması; - Altta yatan plazma hücresi proliferatif bozukluğuna atfedilebilecek uç organ hasarı olması; hiperkalsemi, böbrek yetmezliği, anemi, kemik lezyonları - Kemik iliğinde klonal plazma hücre yüzdesinin %60'tan fazla olması - Serum FLC oranı 100 mg/L ve fazla olması - Manyetik rezonans görüntüleme (MRI) sonucunda 1 veya daha fazla en az 5 mm boyutunda odak lezyonu bulunması

2.2.4.1. MM Evreleme Sistemi

Multipl miyelomda tümör yükü geleneksel olarak Durie-Salmon Evreleme (DSS) ve Uluslararası Evreleme Sistemi (ISS) kullanılarak değerlendirilmektedir. Hastalık biyolojisi en iyi multipl miyelomun moleküler alt tipine, del(17p), kazanç(1q) veya del(1p) gibi ikincil sitogenetik anormalliklerin varlığına veya yokluğuna dayalı olarak yansıtılır. Sitogenetik risk faktörlerine ek olarak, agresif hastalık biyolojisi ile ilişkili diğer iki belirteç ise , yüksek serum laktat dehidrojenaz (LDH) ve dolaşımdaki plazma hücrelerinin varlığıdır. Revize ISS, birleşik bir prognostik indeks oluşturmak için tümör yükü ve hastalık biyolojisi (yüksek riskli sitogenetik anormallikler veya yüksek laktat dehidrojenaz seviyesinin varlığı) unsurlarını birleştirmektedir ve Tablo2-2’de gösterilmektedir (25).

Tablo 2-2: Revize -ISS (28)

Prognostik Faktör		KRİTER
ISS EVRESİ	I	Serumda; β_2 -mikroglobülin seviyesinin 3,5 mg/L’den az olması, albümin seviyesinin 3,5 g/dL veya daha fazla olması
	II	I veya III evresinde olmama
	III	Serum β_2 -mikroglobülin seviyesinin 5,5 mg/L veya daha fazla olması
iFISH ile belirlenen Kromozomal Anomali varlığı	Yüksek risk	Aşağıdaki anomalilerden en az birinin varlığı • del(17p) • t(4;14) • t(14;16)
	Standart risk	Yüksek risk kromozomal anomali olmaması
LDH	Normal	Serum LDH seviyesinin normal düzeyde olması
	Yüksek	Serum LDH seviyesinin normalden fazla olması

MM RİSK SINIFLANDIRMASI İÇİN YENİ MODEL		
R-ISS EVRESİ	I	• ISS evre I olması • Kromozoal anomali için standart risk • LDH seviyesinin normal olması
	II	RISS evre I veya III olmaması
	III	• ISS evre III olması • Kromozal anomali için yüksek risk olması veya serum LDH seviyesinin yüksek olması

2.2.5. MM TEDAVİSİ

Tedavide kullanılan ana ilaç sınıfları arasında alkilleyici ajanlar, kortikosteroidler, immünomodülatör ilaçlar ve proteazom inhibitörleri yer almaktadır. Daratumumab ve isatuksimab, CD38'i hedefleyen monoklonal antikorlardır ve MM tedavisinde giderek daha önemli bir rol oynamaktadır. Diğer aktif onaylı ajanlar arasında SLAMF7 antijenini hedefleyen bir M antikoru olan elotuzumab, bir histon deasetilaz inhibitörü olan panobinostat ve bir exportin-1 (XPO1) inhibitörü olan selinexordur. Bu 3 ilaç tek kullanımda önemli bir etkiye sahip değilken diğer aktif ilaçlarla kombinasyon halinde kullanımları terapötik etkilerini ortaya çıkmaktadır. Antrasiklinler ,diğer aktif ajanlar ile karşılaştırıldığında MM tedavisinde nadiren kullanılmaktadır. Doksorubisin, agresif veya refrakter MM için bazı çoklu ajan kombine tedaviye dahil edilmektedir (24, 26).

Yeni tanı konmuş MM tedavisinde kullanılan en yaygın kombine tedavi yaklaşımları ;lenalidomid,deksametazon (Rd), bortezomib, lenalidomid, deksametazon (VRD), bortezomib, talidomid, deksametazon (VTD) ve bortezomib, siklofosamid, deksametazon (VCD)'dir. MM tedavisinde kullanılan ilaçlar Tablo 2-3 'te belirtilmiştir (29).

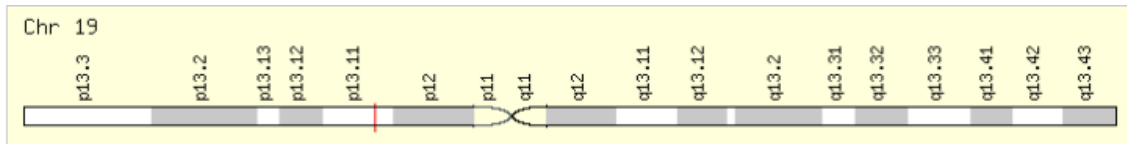
Tablo 2-3: MM tedavisinde kullanılan ilaçlar (24)

İLAÇ İSMİ	İLACIN HEDEFİ
ALKİLLEYİCİ İLAÇ	
MELFALAN	DNA çapraz bağlanmasını ve DNA'nın çift sarmalındaki kopmaları indükler
SİKLOFOSFAMİD	Apoptoza yol açan DNA çapraz bağlarının oluşumu; düşük (metronomik) dozlarda ayrıca bağışıklık uyarıcı aktivite ve antianjiyogenik etkiler
STERODİLER	
DEKSAMETAZON	Glukokortikoid reseptörünün agonisti
PREDNİZOLON	Glukokortikoid reseptörünün agonisti
ANTRASİKLİNLER	
DOKSORUBİSİN	Topoizomeraz II enziminin inhibitör
PROTEOZOM İNHİBİTÖRLERİ	
BORTEZOMİB	Birinci nesil geri dönüşümlü boronik asit proteazom inhibitörü
KARFİLZOMİB	Proteazoma ve immünoproteazoma seçici ve geri dönüşümsüz olarak bağlanan ikinci nesil proteazom inhibitörü
IXAZOMİB	Geri dönüşümlü boronik asit proteazom inhibitörü
İMMÜNOMODÜLATÖR İLAÇLAR	
TALİDOMİD	<i>CRBN</i> 'ye bağlanır ve böylece <i>IKZF1</i> ve <i>IKZF3</i> 'ün proteazomal bozulmasını tetikler, doğrudan anti MM aktiviteye yol açar
LENALİDOMİD	Farklı <i>CRBN</i> bağlanma afinitesi ve özelliklerine sahip olduğu için Talidomide benzer şekilde etki eder.
POMALİDOMİB	Lenalidomid ile karşılaştırıldığında <i>IKZF1</i> ve <i>IKZF3</i> hedef proteinlerini daha güçlü bir şekilde bozar.
HİSTON DEASETİLAZ İNHİBİTÖRLERİ	
PANOİNOSTAT	Pan-deasetilaz inhibitörü

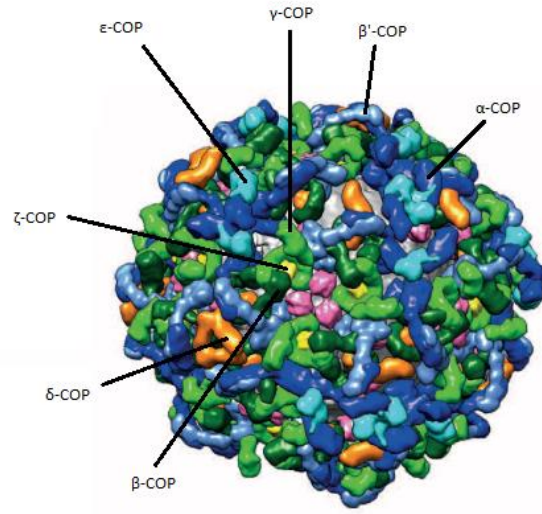
MONOKLONAL ANTİKORLAR	
ELOTUZUMAB	Anti-MM aktiviteye sahip <i>SLAMF7</i> 'ye karşı geliştirilen humanize monoklonal antikordur.
DARATUMUMAB	Klasik Fc bağımlı immün efektör mekanizmalara ve ayrıca immünomodülatör etkilere sahip olup tamamen insan CD38 antikorunu hedefler.
ISATUXİMAB	Doğrudan apoptozu indükleyebilen ve klasik Fc'ye bağlı immün efektör mekanizmalara ve immünomodülatör etkilere sahip kimerik CD38 antikoru hedefler.

2.3. COPE Geni

COPE, (COPI koatomer kompleksi alt birimi epsilon) geni 19. kromozomun kısa kolunun 13.11 bölgesinde yer almaktadır. (Şekil 2-4) COPE, epsilon-COP olarak da bilinmektedir. En uzun transkripti 11 ekzondan oluşmaktadır ve birden fazla transkriptten protein oluşmaktadır. COPI heteroheptamerik yapıya sahiptir ve α -, β -, β' -, γ -, δ -, ϵ - ve ζ -COP alt birimlerinden oluşmaktadır (30). (Şekil 2-5) COPE geni de COPI'nın epsilon alt bitimini kodlamaktadır. COPI kompleksi tersinir olarak iki alt komplekse ayrılmaktadır. Bu kompleksler β , γ -, δ ve ζ -COP'lerden oluşan F-COP I ve α - β' - ve ϵ -COP'lerden oluşan BCOP I olarak adlandırılmaktadır (31).



Şekil 2-4: COPE geninin kromozom lokasyonu (32)



Şekil 2-5: COPI kompleksinin kristal görüntüsü (33)

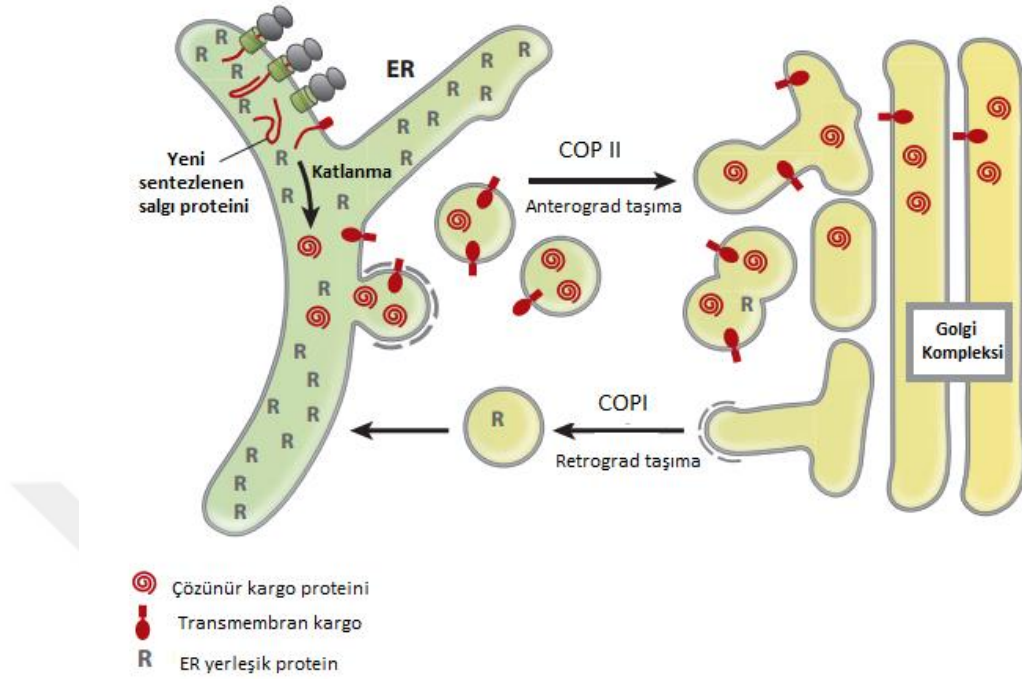
Maruyama ve arkadaşları, androjen reseptörü (AR) sinyalleşmesinde yer alan bir E3 ligazı olan PIRH2 tarafından COPE ubikitinasyonunu göstermişlerdir. Prostat kanseri hücrelerinde, dihidrotestosteron stimülasyonu PIRH2-AR etkileşimini ve COPE ubikitinasyonu ve degradasyonunu indüklemiştir. Androjen reseptörü veya p53 için etkileşen PIRH2, COPE'nin bozulmasına sebep olur. androjen varlığından PIRH2 ve COPE birbirleriyle etkileşir. PIRH2, COPE'ye bağlanır ve onu doğrudan ubikitinasyona uğratarak proteazom aracılı yolun bozunmasına sebep olur. Sonuçlar, PIRH2'nin COP I kompleksi için düzenleyici olarak işlev gördüğünü göstermektedir (34).

Başka bir çalışmada, bir parvovirüs (PPV) NS1 bağlayıcı protein olarak COPE tanımlanmış ve COPE'nin PPV replikasyonu sırasında kritik bir düzenleyici olduğu bulunmuştur. NS1 ile transfekte edilmiş veya PPV ile enfekte olmuş hücrelerde, COPE, NS1 ile etkileşime girmiş ve NS1 ile birlikte çekirdeğe gitmiştir. COPE'nin devre dışı bırakılması, IFN- β 'nin ekspresyon seviyelerini artırarak PPV üretimini inhibe edebilirken, COPE'nin aşırı ekspresyonu, IFN- β 'nin ekspresyon seviyelerini azaltarak PPV üretimini arttırmıştır (35).

Bu çalışmada, obstruktif uyku apnesi (OUA)'lı hastalarda COPE-Ab (COPE-Antikor) düzeylerinin kardiyovasküler ve serebrovasküler olaylarla bir ilişkisi olup olmadığını değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre, COPE-Ab OUA'lı hastalarda kardiyovasküler ve serebrovasküler riskinin biyolojik belirteci olabilir. OSA'lı hastalarda COPI ve dolaşımdaki COPE-Ab'nin kesin hücrel mekanizmaları bu çalışma ile ortaya konmamış olsa da, lipid inflamasyonu bu hasta popülasyonunda yüksek COPE-Ab seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir (36).

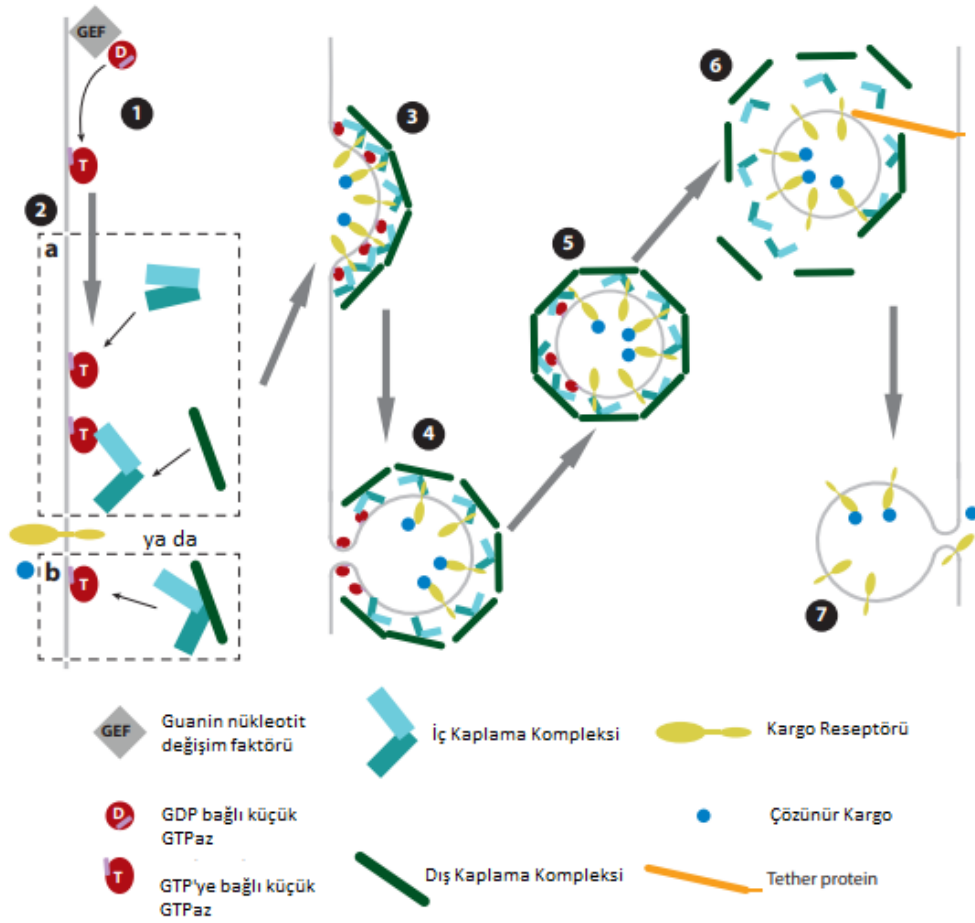
2.3.1. COPI ARACILI TAŞIMA

Salgı yolu boyunca taşınan proteinler, zar proteinleri, çözünür lizozomal/vakuolar proteinleri ve salgılanan proteinlerdir. Ortak sinyal dizilerine sahip olmaları onları diğer proteinlerden ayıran özellikleridir ve endoplazmik retikulum (ER) yönlendirilmelerini sağlamaktadır. Doğru katlanmış proteinlerin nihai varış yerlerine ulaştırılması gerekmektedir. Salgı yolu en az dört farklı adıma ayrılabilir: ER içe alımı /kalite kontrol, ER'den Golgi'ye taşıma, Golgi içi taşıma/ER geri alma ve Golgi sonrası taşıma. (30) Yapısal bileşenleri ve işlevleri açısından üç tip veziküler taşıyıcı olarak karakterize edilmiştir: Geç salgı yolunda ve endositik yolda taşımaya aracılık eden klatrin kaplı veziküller, erken salgı yolunda işlev gören COPI kaplı veziküller ve proteinleri ER'den taşımaya sağlayan COPII vezikülleri. Şekil 2-6'da gösterilmiştir (37).



Şekil 2-6: ER -Golgi arasında anterograd ve retrograd taşıma (38)

COPI vezikül oluşumu, küçük GTPaz Arf1'e bağlıdır ve zara bağlı Arf1-GTP, COPI vezikülleri oluşturmak için yedi koatomer alt birimini Golgi zarlarına blok halinde toplar. Arf1'e özgü guanin nükleotid değişim faktörü ve GTPaz aktive edici proteinler, erken salgı bölmelerinde lokalize olur ve spesifik kargoyu COPI veziküllerine dahil etmek için COPI tomurcuklanma döngüsünü düzenler. COPI alt birimleri, *dilysine* ve *difenilalanin* motifleri dahil olmak üzere transmembran proteinleri üzerindeki tanımlanmış retrograd sinyallerini tanır (38).



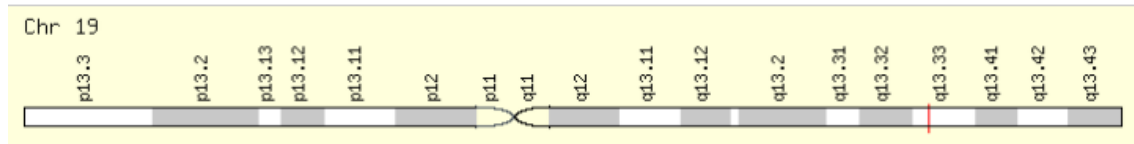
Şekil 2-7: COPI tomurcuklanması ve kargo taşınımı (30)

Veziküllerin oluşumunun başlamasıyla, membrana giren hidrofobik elementler için ve koatmer proteinlerinin toplanması için bağlanma bölgeleri açığa çıkar. Sonrasında, koatmer proteinleri bir araya toplanır ve konformasyonel değişikliklere uğrar. Zar pozitif eğrilik kazanır ve sonunda negatif eğrilik ile dar bir boyun oluşturan büyüyen bir kaplanmış tomurcuk verir. Tomurcuk donör membrandan ayrılır. Hedef zarlar kaynaşmadan önce kaplamaları ayrılır (30). Kaplama salınımı, küçük GTPazlarda GTP hidrolizini uyaran GTPaz aktive edici proteinlere (GAP'ler) ve kararsızlaştırabilen bağ proteinlerine bağlıdır. Serbest bırakılan veziküller daha sonra hedef zarlarına gider ve kenetlenir. COPI vezikülleri, Golgi aparatından ER'ye ve Golgi aparatı içinde protein taşınmasına aracılık eder (30).

Kargo golgi aygıtına vardıktan sonra, COPI veziküllerine paketlenir ve ER'ye geri alınır. (Şekil 2-7). Geri alma, çok sayıda ER yerleşik proteinin C-terminal sitoplazmik kuyruklarında bulunan K(X)KXX dizisi veya çözünür ER yerleşik proteinler üzerinde bulunan ve COPI kaplaması ile etkileşime giren spesifik reseptörler tarafından tanınan kargo imzaları arasındaki özel etkileşimlerle gerçekleştirilir (30).

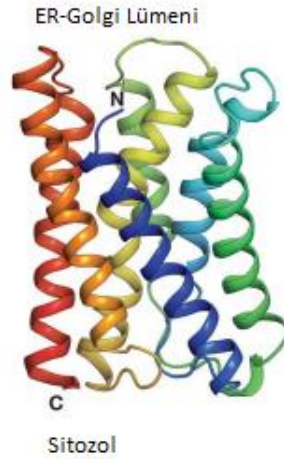
2.4. KDEL R1 Geni

KDEL R1 (*KDEL Endoplasmic Reticulum Protein Retention Receptor 1*) geni 19. kromozomun uzun kolunun 13.33 (19q13.33) bölgesinde yer almaktadır. (Şekil 2-8) KDEL R1 geni ERD2, ERD2.1, HDEL olarak da adlandırılmaktadır. Bu gen 5 ekzondan oluşmaktadır ve gene ait birden fazla protein kodlayan transkriptleri vardır. KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) reseptörü, üç gen tarafından kodlanan KDEL R1, KDEL R2 ve KDEL R3 olmak üzere üç izoforma sahiptir (39). Reseptörün 3 izoformunda yüksek oranda yapısal homoloji göstermesine rağmen her izoformun farklı ligandları bulunmaktadır (40). 1990 yılında Lewis ve ark. yaptığı çalışmada mayadaki HDEL reseptörüne homolog olan insan KDEL R1 genini tanımlamıştır (41).



Şekil 2-8: KDEL R1 geninin kromozom lokasyonu (42)

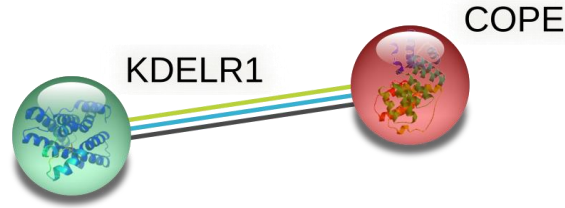
KDEL R, yedi transmembran alanına sahip integral membran proteini kodlar. Reseptörün N-terminali organellerin lümenine bakar, C-terminali ise sitozolde bulunur (43). Şekil 2-9'da protein yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2-9: KDELR1 protein yapısı (44)

Homeostatik koşullar altında, proteinler bir karboksi-terminal ER tutma dizisi (ERS) yoluyla ER lümeninde korunur (45). ER’de yerleşik proteinler, bir C-terminal tetrapeptid, KDEL veya ER tutma sinyali olarak ilgili motifler içermektedir. ER proteinleri Golgi’ye ulaştığında, KDEL reseptörleri KDEL ve ilgili motifleri tanımaktadır (46). KDEL motifli proteinler, ER-Golgi ara bölgesinde veya cis-Golgi’de reseptör ile etkileşime girer. Bu etkileşim, reseptörde konformasyonel bir değişikliğe neden olur ve kompleksin ER’ye geri alınan veziküllere paketlenmesi ile sonuçlanır (40).

Yeniden katlanma için katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinleri hedefleyerek UPR sinyalini uyaran şaperonlar KDEL motifi içermektedir. KDEL dizisi içeren ER lokalize olan göze çarpan proteinler arasında BiP/Grp78, Grp94 ve PDI yer almaktadır (47). KDEL reseptörleri cis-Golgi’de bulunur ve ERS içeren proteinleri COPI vezikül aracılı retrograd taşıma yoluyla ER’ye retrograd olarak taşır (48). ER’de daha yüksek pH, KDEL motifinin reseptörden ayrılmasına ve ardından boş reseptörün geri dönüştürülmesine neden olmaktadır (40). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada; salgı yolağında reseptöre KDEL dizisi bağlanması sonucu konformasyonel değişikliklere uğradığı ve KDEL sinyalinin karboksil ucunun tanınmasında pH’a bağımlı bir etkileşim olduğu gösterilmiştir (44). Şekil 2-10’da KDELR1 ve COPE gen etkileşimi gösterilmiştir.

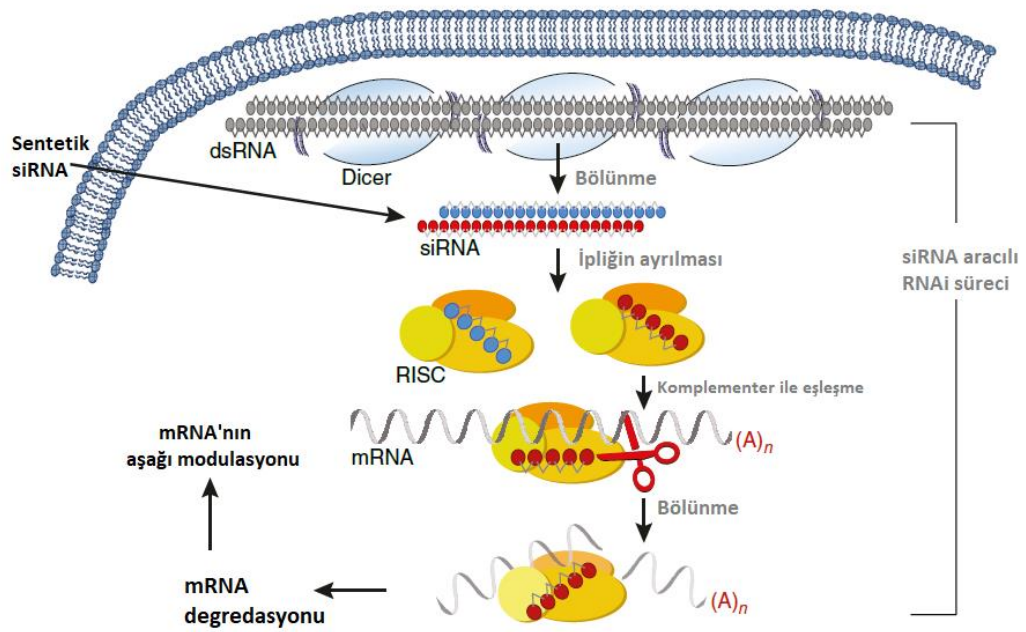


Şekil 2-10: STRING veritabanında KDEL R1 ve COPE genlerinin etkileşimi (49)

2.5. RNA İNTERFERANS

RNAi (RNA interferans), diğer nükleik asit bazlı yaklaşımlara göre birçok avantajı olan ve bu nedenle fonksiyonel genomikte yaygın olarak kullanılan gen susturma tekniğidir. siRNA'lar, 1998'de Andrew Fire ve Craig Mello'nun nematod *Caenorhabditis elegans*'a dsRNA enjekte etmesi ve aynı diziyi içeren mRNA'larda güçlü bir diziye özgü bozunmasının başlatmasıyla keşfedilen RNAi yolunun efektör molekülleridir. Nematodlarda RNAi'nin keşfi ile çalışmalar hızla geliştirilmiş ve sonrasında hemen hemen tüm yüksek ökaryotlarda meydana geldiği bulunmuştur (50). Viral vektörler, peptitler, polimerler ve lipidler ile siRNA hedef hücreye taşınır (51). ER zarı üzerindeki fonksiyonel proteinler, siRNA'nın hücre içi trafiğinde önemli bir role sahiptir, siRNA'nın endozom-lizozom yolu yerine endozom-Golgi-ER yolu yoluyla sitoplazmaya ulaşmasına yardımcı olur ve böylece siRNA'nın lizozomal bozulmasını önler. Elektroporasyon yöntemi ile, siRNA'nın hücre zarını doğrudan geçmesi sağlanır ve bu da endozomal kaçış sorununun üstesinden gelmek için etkili bir yaklaşım oluşturur (52).

RNAi'nin ilk adımı, dsRNA'nın siRNA'lara işlenmesini ve bölünmesini içermektedir (53). Genellikle her bir zincirin 3' ucunda 2 nükleotit çıkıntısı bulunur. Bu işlemde sorumlu enzim, Dicer olarak adlandırılan RNase III benzeri bir enzimdir. Enzim dsRNA'yı, 5' fosfat ve 3' hidroksil uçları içeren ve 3' ucunda 2 nükleotit çıkıntısı içeren 21 -25 nükleotid uzunluğundaki siRNA duplekslerine ayırır. Oluşan siRNA'lar, RISC (RNA kaynaklı susturma kompleksi) olarak adlandırılan bir çok proteinli bileşen kompleksi ile bağlanır. RISC kompleksi içinde, siRNA dizileri ayrılır ve daha kararlı 5'-ucuna sahip iplik aktif RISC kompleksine entegre edilir. Antisens tek sarmallı siRNA bileşeni daha sonra RISC kompleksini hedef mRNA üzerinde yönlendirir ve hizalar. Argonaute ailesinin bir üyesi (Ago2) olan katalitik RISC proteininin etkisiyle hedef mRNA bozunması gerçekleşir (50, 51).



Şekil 2-11: siRNA aracılı RNA interferans (54)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. RPMI8226 ve U266 hücre hatları

İnsan multipl myelom hücre soyu olan U266 (U266B1,TIB-196™) ve RPMI8226 (CRM-CCL-155™) hücreleri ATCC hücre kültürü koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.1.2. Kimyasallar ve Kitler

RPMI 1640, with Stable Glutamine, (CAPRICORN SCI)

PBS 1X, w/o calcium and magnesium, (WISENT MULTICELL)

Trypsin 0,05%/ EDTA 0,53mM in HBSS 1X (WISENT MULTICELL)

Apoptosis/ Necrosis Assay Kit (blue, green, red) (ABCAM)

KDELRL1 siRNA, (Thermo Fisher)

NT siRNA, (QIAGEN)

Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent (Thermo Fisher)

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher)

Primerler, (Thermo Fisher)

Penicilin-Streptomisin (Pen-Strep,10,000 U/ml) (ThermoFisher Scientific)

Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium (Thermo Fisher Scientific)

PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen)

Dimetil Sülfoksit (DMSO)(Cryo-Sure) cell culture grade (BIOMATİK)

CyQUANT™ MTT Cell Viability Assay (Invitrogen)

FBS (CAPRICORN FBS-HI-11A)

Nucleofector Kit V (Lonza, VCA-1003)

3.1.3. Cihazlar

Buzdolabı -80 (Thermo Scientific)

Buzdolabı +4 /-20 (beko)

PZR Cihazı (Biorad)

Vorteks (Stuart)

İnkübatör (Thermo Electron Corporaiton)

Laminar Akışlı Steril kabin (Nuanre)

Mikroskop (Olympus)

Multiskan Spektrum (Thermo Electron Corporation)
Nanodrop200 Spektrofotometre (Thermo Scientific)
MikroSantrifüj (beckman)
Pipet Seti (Gilson)
Light Cyclers 480 -II (Roche)
Sıvı Azot Tankı (StateBourne)
Su Banyosu (Mettler)
Distile Su Cihazı (Milipore)
Buz Makinesi (Cornelius)
Vi-Cell Hücre Sayım Cihazı (Beckman Coulter)
Otoklav (ALP CL-40M)
Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (LEİCA TCS SPE)
Amaxa™ Nucleofector™ II (Lonza)

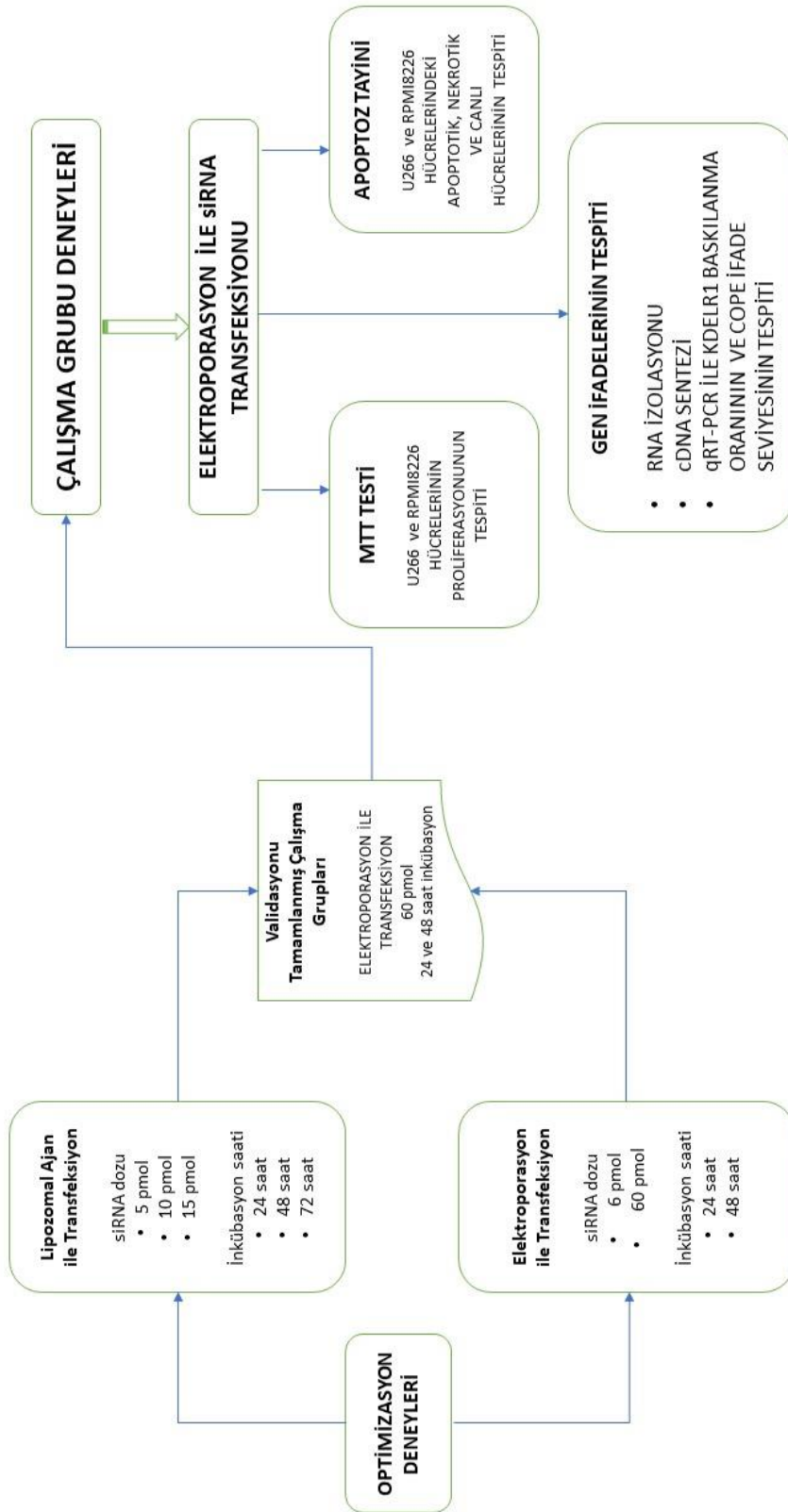
3.2. YÖNTEM

Deneylerde 2 farklı multipl miyelom hücre soyu olan U266B1(U266) ve RPMI8226 hücreleri kullanıldı. Bu hücrelerde KDELR1 geninin anlatımının baskılanması hedeflendi. Optimizasyon deneylerine lipozomal bir ajan olan öncelikle Lipofectamine™ 2000 transfeksiyon ajanı ile başlandı. Hücrelere verilecek uygun siRNA dozunu belirlemek amacıyla 96 kuyulu hücre kültür kabında 5,10,15 pmol siRNA denemesi yapıldı. Hücreler 24 saat boyunca 37°C 'de inkübe edildi. Daha sonra hücreler kültür kabından toplanarak RNA izolasyonu ve ardından cDNA sentezi yapıldı. KDELR1 geninin baskılama oranı qRT-PZR yöntemi ile belirlendi. Gen anlatımının baskınlanması için gereken siRNA dozu 15pmol olarak belirlendi.

Optimizasyon sonrası çift kopya olacak şekilde 15pmol KDELR1 siRNA için 24,48 ve 72 saat dilimlerinde olacak şekilde deney kuruldu. Pozitif kontrol olarak hedefsiz (NT) siRNA ve negatif kontrol olarak hiçbir muamele yapılmamış hücreler (NTC) 96 kuyulu hücre kültür kabında çalışmalar gerçekleştirildi.

Lipofectamine™ 2000 transfeksiyon ajanı ile yapılan çalışma grubu deneylerinin qRT-PZR sonucu analizinde KDELR1 geninin anlatım seviyesinde anlamlı bir baskılanma olmadığı görüldü. Bu sebeple siRNA'yı hücrelere transfekte etme yöntemi değiştirilerek elektroporasyon yöntemi denendi. Optimizasyon deneyleri 24 saat diliminde 6 ve 60 pmol siRNA olarak belirlendi. Elektroporasyon yöntemi ile yapılan transfeksiyonda Amaxa Cell Line Nucleofactor için özel yapılmış küvetler kullanıldı. transfeksiyon ortamı Opti-MEM medyumunu ile sağlandı.





Şekil 3-1: İş akış şeması

3.2.1. Hücre Kültürü

Sıvı azotta saklanan U266 ve RPMI8226 hücreleri 37°C'lik su banyosunda ısıtılarak %15 FBS içeren besiyeri içerisine alındı. 800 xg'de 5 dk santrifüj edilerek DMSO içeren dondurma medyumunu uzaklaştırıldı. Hücreler T25 hücre kültür kaplarına alındı ve ml başına 5×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Yatay bir şekilde 37°C'de inkübatöre kaldırıldı. Hücreler ilk ekimde %15'lik FBS içeren besiyeri içine alındı ancak sonraki pasajlamalarda %10 FBS içeren besiyeri ile devam edildi. (Tablo 3-1) Gün aşırı pasajlama yapma gerekmeyen durumlarda pasajlama yapmak yerine besiyeri değiştirildi. Mikroskopta hücre yoğunluğu ve şekli kontrol edildikten sonra pasajlamaya geçildi. İki hücre hattı da yarı yapışık olduğu için pasajlama yapılırken kültür kabındaki süpernatant tamamen çekilip falkona alındı. İçinden devam ettirilmek amacıyla 1 ml'si ayrı bir tüpe alındı ve santrifüj edilmedi. Yüzeye yapışan hücrelerin tersi yönünde PBS verilerek yıkama yapıldı. Üzerine tripsin verilerek hücreler yüzeyden ayrılana kadar 37°C'de derecede inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda tripsin inaktivasyonu için besiyeri eklenerek yapışan hücreler toplandı. Süpernatant ile aynı falkona alınarak 800xg'de 5dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler, sayılarına göre uygun miktardaki medyuma alındı ve içine süpernatanttan ayrılan 1ml medyum eklenerek ekim gerçekleştirildi. Pasajlama işlemleri 2-3 günde bir gerçekleştirildi.

Tablo 3-1: RPMI 1640 besiyeri hazırlanması

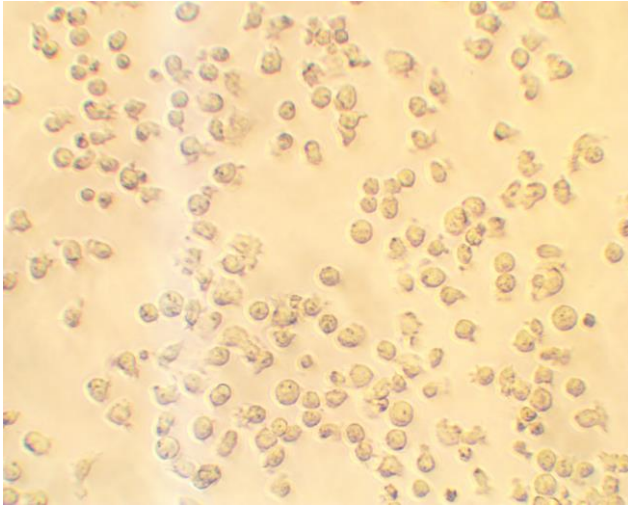
Bileşen	%10 FBS için	%15 FBS için
RPMI 1640, with Stable Glutamine	445 ml	42ml
FBS	50ml	7,5ml
Penisilin-Streptomisin	5ml	0,5ml
TOPLAM	500ml	50ml

3.2.2. Hücre Sayısı ve Canlılığının Belirlenmesi

Hücrelerin istenen sayı ve canlılığına ulaştığını belirlemek amacıyla VİCELLXR cihazı kullanıldı. Cihaz canlı ve ölü hücreleri ölçmek için 50 farklı fotoğraf çeker. Canlılık yüzdesini 1 ml içindeki canlı hücre sayısını toplam hücre sayısına oranlayarak belirler. Hücreler 1ml besiyeri içerisinde cihaza uygun sayma tüplerine alınarak ölçümler yapıldı. Ölçüm sonucunda canlılık için % değer ve ml başına düşen hücre sayısı bilgilerine göre deney planı gerçekleştirildi.



Şekil 3-2: U266 hücreleri ışık mikroskobu 10x mercek görüntüsü



Şekil 3-3: RPMI8226 hücreleri ışık mikroskobu 10x mercek görüntüsü

3.2.3. Optimizasyon Deneyleri

3.2.3.1. Lipozomal ajan ile transfeksiyon

Hücreler istenilen sayı ve canlılığa ulaştığında Lipofectamine 2000™ transfeksiyon ajanının protokolüne uygun şekilde optimizasyon deneylerine geçildi. Hücreler 96 kuyulu hücre kültür kaplarında kuyu başına 30.000 hücre 100 µl antibiyotiksiz medyum içerisinde olacak şekilde ayarlandı. Tüm gruplar çift kopya çalışıldı. KDELR1 siRNA ve NT siRNA gruplarına kit protokolüne uygun şekilde siRNA+lipozomal ajan verildi. Uygun dozun belirlenmesi için 5,10 ve 15 pmol siRNA miktarı seçilerek 3 deneme grubu oluşturuldu. 24 saatin sonunda hücreler toplandı. RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve ardından qRT-PZR aşamalarına geçildi. Yapılan analiz sonucu 15 pmol'de anlamlı bir baskılanma oranı elde edildi.

Tablo 3-2: Lipofectamine 2000 ile yapılan optimizasyon deneyleri kuyu içeriği

BİLEŞENLER	5 PMOL	10 PMOL	15 PMOL
Sirna(10pmol) (µl)	0,5	1	1,5
Lipofectamine 2000 (µl)	0,25	0,25	0,25
OptiMEM (µl)	50	50	50
Antibiyotik İçermeyen			
%10 Fbs Rpmı1640	100	100	100
Medyum (µl)			

24,48 ve 72 saat dilimlerinde çalışılacak şekilde çalışma grubu deneyleri tasarlandı. Deneyler sonucunda yapılan analizlerde 3 saat diliminde de KDELR1 gen anlatım seviyesinin yeteri kadar baskılanmadığı belirlendi. Bu durumda transfeksiyon yöntemi değiştirilerek elektroporasyon ile optimizasyon deneylerine geçildi.

3.2.3.2. Elektroporasyon yöntemi ile transfeksiyon

Bu yöntemde hücelere elektrik uygulanması sonucu porların açılması sayesinde transfeksiyon gerçekleştirilmektedir. Amaxa Nucleofactor II™ cihazında tek bir küvette U266 için 1×10^6 ve RPMI8226 için 3×10^6 hücreye siRNA transfeksiyonu aşağıdaki gibi yapıldı.

1. Hücreler gruplandırılarak hücre kültür kaplarından gerektiği kadar tüplere alındı.
2. Hücreler 90xg'de 10dk boyunca santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
3. Pellet 100 µl Opti-MEM ile iyice çözdürüldü ve 6 ve 60 pmol olacak şekilde siRNA verildi.
4. Kitin içinden çıkan küvetlere içeride hava balonu oluşturmayacak şekilde karışım verildi.
5. *Nucleofactor II* cihazında U266 hücreleri için X-005, RPMI8226 hücreleri için G-16 programında transfeksiyon gerçekleştirildi.
6. Küvetlerin üzerine 500 µl antibiyotik içermeyen besiyeri eklendi ve 24 kuyulu hücre kültür kaplarına hücreler aktarıldı.

Bu işlemler KDELR1 siRNA ve NT siRNA için gerçekleştirildi. 24.saatın sonunda hücreler toplandı ve gen ifadesini ölçmek için qRT-PZR yapıldı. Gen ifade seviyesinin baskılanmasının 60 pmol de anlamlı olduğu bulundu. Bu yöntem ile optimizasyonun sağlanmasından sonra çalışma grubu deneylerine geçildi. Çift kopya olacak şekilde 60 pmol KDELR1 siRNA, NT siRNA ve NTC çalışma grupları belirlendi. İnkübasyon süresi biten hücreler toplandı. Total RNA izolasyonundan sonra cDNA sentezlenerek qRT-PZR yöntemi ile gen ifadesi kantitatif olarak belirlendi.

3.2.3.3. RNA izolasyonu

PureLink RNA Mini Kit protokolüne uygun şekilde aşağıdaki gibi RNA izolasyonu yapılmıştır;

1. Kuyulardaki besiyeri tamamen çekildi ve kuyulara verilen 1X PBS ile birlikte tüplere alındı.
2. 1500 rpm’de 5dk santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırıldı.
3. Pelletin üzerine 50µl 1XPBS verildi tekrar santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst sıvı uzaklaştırıldı.
4. Kuyuların üzerine 300µl taze hazırlanan RLT eklenip yüzeydeki hücreler toplandı ve tüplerdeki pellet çözdürüldü.
5. RLT içerisindeki hücrelerin üzerine 1:1 oranında yani 300 µl kitin içerisinde çıkan suyla hazırlanan %70 etanol eklendi. İyice pipetlenerek spin kolonlara aktarıldı.
6. Kolonlar 12.000xg’de 15 sn santrifüj edildi. Filtrenin altındaki toplama tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldı.
7. Kolonların üzere 700µl Wash Buffer I eklendi ve 12.000 xg’de santrifüj edildi. Alta geçen sıvı uzaklaştırıldı.
8. Kolonların üzerine 500µl Wash Buffer 2 eklendi ve 12.000xg’de santrifüj edildi. Alta geçen sıvı uzaklaştırıldı. Bu adım 2 kez gerçekleştirildi.
9. Spin kolonlar 2dk boyunca 12.000xg’de boş şekilde santrifüj edildi.
10. Kolonlar saklama toplama tüplerine aktarıldıktan sonra tam filtrenin üzerine gelecek şekilde 30µl RNase-free su eklenip 1 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından en yüksek hızda 2dk santrifüj edildi ve tüpler buza alındı.

RNA miktarının tayin edilmesi amacıyla Nanodrop-2000 cihazı kullanıldı. Cihazda OD değeri ölçülen RNA örnekleri -80°C’de saklandı.

3.2.3.4. cDNA sentezi

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit ile aşağıdaki gibi protokole uygun şekilde cDNA sentezi gerçekleştirildi. Tüm işlemler buz üzerinde çalışıldı.

1.RNA miktarlarının hepsi 1000ng'a sabitlendi ve 10 µl den az olan RNA örneklerinin üzerleri su ile tamamlandı.

Tablo 3-3: cDNA reaksiyonu karışım içeriği

Bileşen	Miktar (µl)
10x RT tampon çözelti	2
25X dNTP karışımı	0,8
10X Random primer	2
Ters Transkriptaz	1
Rnaz İnhibitör	1
Su	3,2
Total karışım miktarı	10

2.Tablo 3-3'deki gibi hazırlanan reaksiyon karışımı 10µl'ye tamamlanan RNA örneklerine dağıtıldı.

3.Tüplere kısa bir spin atıldıktan sonra Isıl döngü cihazında aşağıdaki kondisyonlarda (Tablo 3-4) reaksiyon gerçekleştirildi.

Tablo 3-4: cDNA reaksiyon koşulları

Sıcaklık	Zaman
25°C	10 dakika
37 °C	2 saat
85 °C	5 dakika

4.Reaksiyon sonucunda örnekler Nanodrop-2000 cihazında ölçüldü.-20°C'de saklandı.

3.2.3.5. Primer Tasarımı

KDELR1 ve COPE genlerine özgü primerlerin tasarlanması için web tabanlı NCBI Primer-BLAST ve UCSC In-Silico PCR araçları kullanıldı. Sentezleyen firmanın belirttiği miktarlarda liyofilize olarak gelen primerler 100pmol/μl 'ye sulandırılarak ana stok elde edildi. qRT-PZR yönteminde kullanılmak üzere ana stoktan 1:10 dilüsyon yapıldı.(Tablo 3-5)

Tablo 3-5: TBP, KDELR1 ve COPE primer dizi bilgileri

Gen adı	Primer Adı	Primer dizisi
TBP	TBP-F	5'-ACT TGA CCT AAA GAC CAT TGC AC-3'
	TBP-R	5'-CTT GAA GTC CAA GAA CTT AGC TGG-3'
KDELR1	KDELR1-F	5'- GTC GTT CCC ACA GCC ATT CT -3'
	KDELR1-R	5'- AAG CCC TCG AAA TGG TAG CG -3'
COPE	COPE-R	5'- AGA CGA GCT GTT CGA CGT AA -3'
	COPE-F	5'- GAG GTA GTC AGC AAA CAT GCG -3'

3.2.3.6. qRT-PZR

qRT-PZR aşamasında Bioline SensiFAST SYBR® No-ROX floresan boya kullanıldı. SYBR Green I floresan bir boyadır. Bu boya dsDNA'ya spesifik olmayan bir şekilde bağlanır. SYBR Green I, dsDNA'nın minör oluğuna bağlandığında, serbest olduğu halinden 1.000 kat daha fazla floresan ışımaya yayar. Bu nedenle, reaksiyonda bulunan dsDNA miktarı ile doğru orantılı şekilde SYBR Green I'den gelen floresan sinyali oluşmaktadır.

KDELR1 ve referans gen olarak seçilen TATA bağlanma proteinine (TBP) özgü primerler ile reaksiyon karışımı hazırlandı. Tablo 3-7'de belirtilen koşullarda reaksiyon gerçekleştirildi.

1. TBP ve KDELR1 için ayrı karışımlar hazırlandı. (Tablo 3-6)
2. Her kuyuya 8µl karışım dağıtıldı ve 2µl cDNA eklendi.
3. Standartlarda 2µl olacak şekilde TBP karışımlarının olduğu kuyulara eklendi.
4. Her örnek iki kopya olarak çalışıldı.

Tablo 3-6: Her bir kuyu için qRT-PZR reaksiyon karışımı

Bileşen	Miktar (µl)
2X SYBR Tampon çözeltisi	5
Primer F	1
Primer R	1
H ₂ O	1
cDNA	2

Tablo 3-7: qRT-PZR koşulları

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Ön Denatürasyon	95	5 dk	1
Amplifikasyon	95	10 sn	45
	64	20 sn	
	72	10 sn	
Melting Curve	95	5 dk	1
	65	1 dk	
	97	-	
Soğutma	4	30 sn	1

3.2.4. Çalışma Grubu Deneyleri

3.2.4.1. Elektroporasyon ile siRNA transfeksiyonu

U266 ve RPMI8226 hücrelerinde yüksek oranda baskılama yapabilmek amacıyla Amaxa Nucleofector Kit küvetleri ve Opti-MEM™ medyumunu kullanıldı. U266B1 hücreleri X-005 ve RPMI8226 hücreleri G-16 programında protokole uygun şekilde transfeksiyon gerçekleşti. RNA ve apoptoz tayini grupları 24 kuyulu hücre kültür kaplarında iki kopya ve MTT testi için 96 kuyulu hücre kaplarında 3 kopya olacak şekilde tasarlandı. Toplamda 1×10^6 U266 hücrelerine ve 3×10^6 RPMI8226 hücrelerine belirlenen doz olan 60pmol KDELR1 siRNA verildi. Aynı işlemler NT grubu içinde gerçekleştirildi. Tüm çalışma grubu deneyleri 24 ve 48 saat inkübasyon süresinde gerçekleşti.

3.2.4.2. qRT-PZR yöntemi ile KDELR1 gen ifadesinin baskılanmasının kantitatif olarak belirlenmesi

24. ve 48. saatin sonunda hücreler uygun şekilde toplandı. Total RNA izolasyonu ve ardından cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA örnekleriyle referans gen olarak seçilen TBP ve KDELR1 genlerinin kantitatif olarak analiz edildi. KDELR1 gen ifadesinin baskılanma oranı hesaplandı.

3.2.4.3. qRT-PZR yöntemi ile COPE gen ifadesinin kantitatif olarak belirlenmesi

24. ve 48. saatin sonunda hücreler uygun şekilde toplandı. Total RNA izolasyonu ve ardından cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA örnekleriyle referans gen olarak seçilen TBP ve COPE genlerinin ifadesi kantitatif olarak analiz edildi. Her iki hücre hattında da deney grupları arasında COPE geninin kantitatif olarak değişimi belirlendi.

3.2.4.4. MTT Testi

Tüm işlemler her iki hücre hattı için gerçekleştirildi. MTT ile proliferasyon tayini yapmak için *CyQUANT MTT Cell Proliferation Assay Kit* kullanıldı. Kit protokolüne uygun şekilde 5mg MTT üzerine 1ml 1XPBS eklenerek final konsantrasyonu 12mM MTT stok solüsyonu elde edildi.

24 ve 48 saat inkübasyon sürelerinin sonunda 96 kuyulu kültür kaplarındaki deney gruplarının her kuyusuna 10µl MTT stok solüsyonu eklenerek 37°C’de inkübatörde 3 saat bekletildi. Sürenin sonunda kültür kabı 3500rpmde 10dk santrifüj edilerek hücrelerin ve tuzların çökmesi sağlandı. Ardından kuyulardaki sıvı pipet ile çekildi ve üzerine Tablo 3-8’de belirtilen miktarlarda DMSO eklendi. homojen bir karışım elde edildikten sonra hücreler 10dk boyunca 37°C’de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından Multiskan Spektrum cihazında 540 nm’de absorbans değerleri ölçüldü.

Tablo 3-8: MTT testi kuyu başı eklenen DMSO miktarları

HÜCRE HATTI	DMSO (μ L)
U266	100
RPMI8226	80

3.2.4.5. Apoptoz Tayini

Apoptoz tayini için *Apoptosis/ Necrosis Detection Kit (blue, green, red)* kullanıldı. Kit protoklüne uygun şekilde işlemler gerçekleştirildi. Hücreler ilgili kuyulardan toplandıktan sonra kit içeriğindeki Test Tamponu hücre pelletlerine 100 μ l verilerek yıkama yapıldı. Tüpler 1500xg'de 5dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Bu işlem 2 kez gerçekleştirildi. Bu adımdan sonraki işlemlere karanlıkta devam edildi.

1. 900ul Test Tamponu içerisine 6 μ l 7-AAD, 3 μ l Cytocalcein violet 450 ve 3 μ l Apopxin Green eklenerek karışım elde edildi. Bu karışım ile KDEL1 siRNA ve NTC gruplarının hücre pelletleri çözündürüldü.
2. Boya karışımı içerisine alınan hücreler karanlık ortamda oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edildi.
3. İnkübasyonun sonunda santrifüj yapılarak süpernatant uzaklaştırıldı.
4. Pelletler 100 μ l Test Tamponu ile yıkandıktan sonra pelletler Test tamponu ile çözündürülerek lam üzerine yayıldı ve üzeri lamel ile kapatıldı.

5. Konfokal lazer taramalı mikroskopta 3 ayrı kanaldan görüntüleme yapıldı. Apoptotik hücreler, *Apoptin Green'in* fosfotidil serin (PS)'ye bağlanması nedeniyle yeşil görünecektir ve FITC kanalı (Ex /Em = 490/525 nm) kullanılarak görselleştirildi. 7-AAD boyamasından sonra Texas Red kanalı (Ex / Em = 550/650 nm) ile nekrotik hücreler kırmızı renkte ve *CytoCalcein Violet 450* ilavesinden sonra violet kanalı (Ex / Em = 405/450 nm) ile canlı hücreler mavi olarak görselleştirildi.
6. Her kanal için ayrı olarak alınan görüntüler analiz edildi. Ücretsiz bir yazılım olan java tabanlı ImageJ programına görüntüler alındı ve Image -Type- 8-bit yapıldı. Image-Adjust-Threshold seçildi ve gerekli ayarlamalar yapıldı. Analyze kısmındanda hücreler programa tanıtılarak hücre sayımları gerçekleştirildi. Apoptotik, nekrotik ve canlı hücreler oransal olarak her çalışma grubu için hesaplandı.

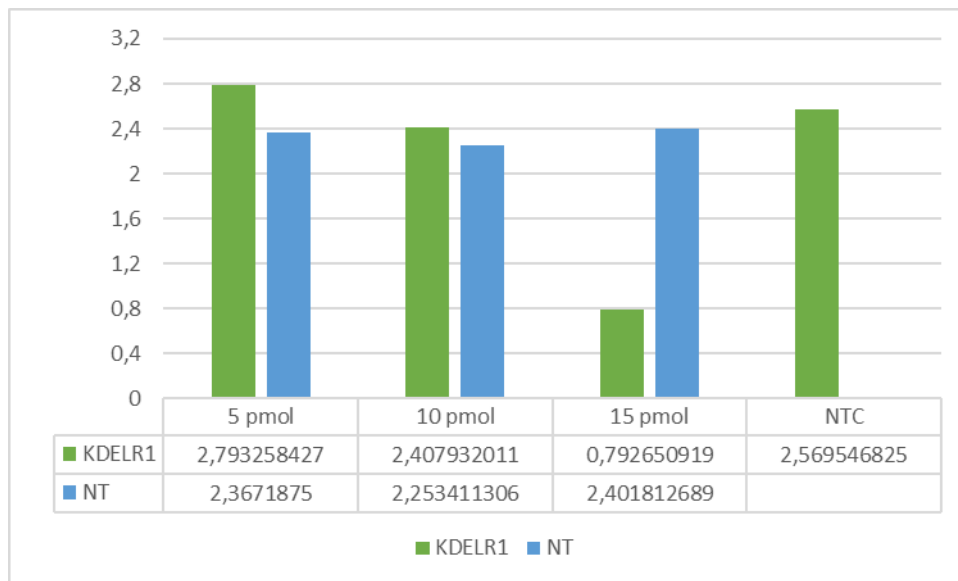
4. BULGULAR

KDELR1 geninin multipl miyelom hücre hattı olan U266 ve RPMI8226 hücre hatlarındaki fonksiyonunu anlamak için, hücrelerde KDELR1 gen anlatımı baskılanarak COPE gen ifadesi değişimi, MTT testi ve apoptoz tayini için analizler yapılmıştır.

4.1. Optimizasyon deneylerinin sonuçları

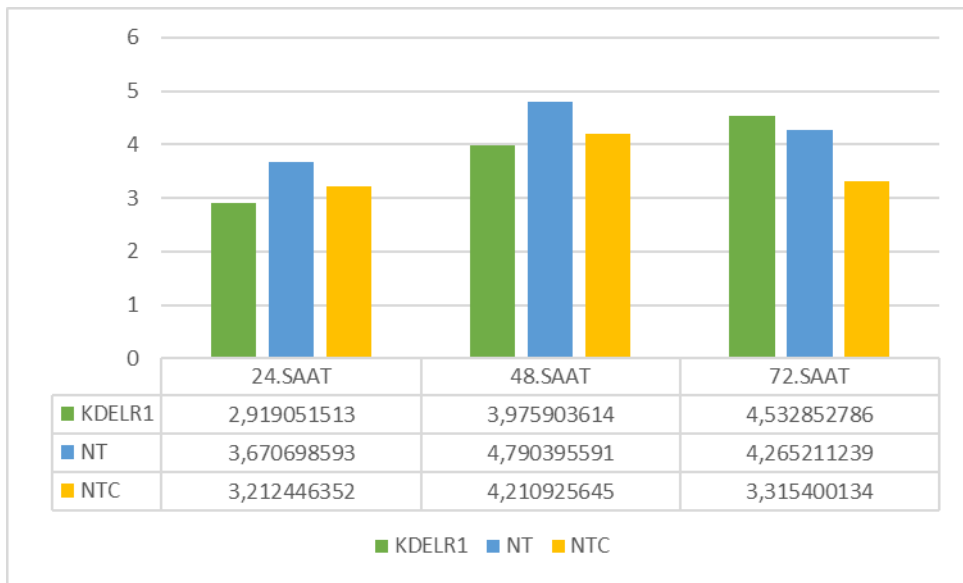
4.1.1. Lipozomal ajan ile yapılan optimizasyon deneyi sonuçları

Tüm gruplar ikili kopya olarak çalışıldı. Yapılan qRT-PZR ile elde edilen sonuçlardan $\Delta\Delta C_t$ metodu ile hesaplama yapıldı. Hesaplama sonucunda %66,8 ile en yüksek baskılama oranının 15 pmol siRNA muamelesinde olduğu belirlendi. 5 pmol ve 10 pmol siRNA muamelesi yapılan gruplarda pozitif kontrol olan NT siRNA grubu ve negatif kontrol grubu olan NTC gruplarıyla karşılaştırılma yapıldı. 5 ve 10 pmol siRNA muamelesi sonucunda KDELR1 gen ifadesinde baskılanma olmadığı görüldü. (Şekil 4-1) Tüm optimizasyon grupları 24,48 ve 72. saat inkübasyon sürelerinde değerlendirildiğinde en anlamlı baskılama oranının 24 saatlik inkübasyonda olduğu belirlendi.



Şekil 4-1: Lipozomal ajanla yapılan farklı siRNA miktarlarında baskılama sonuçları

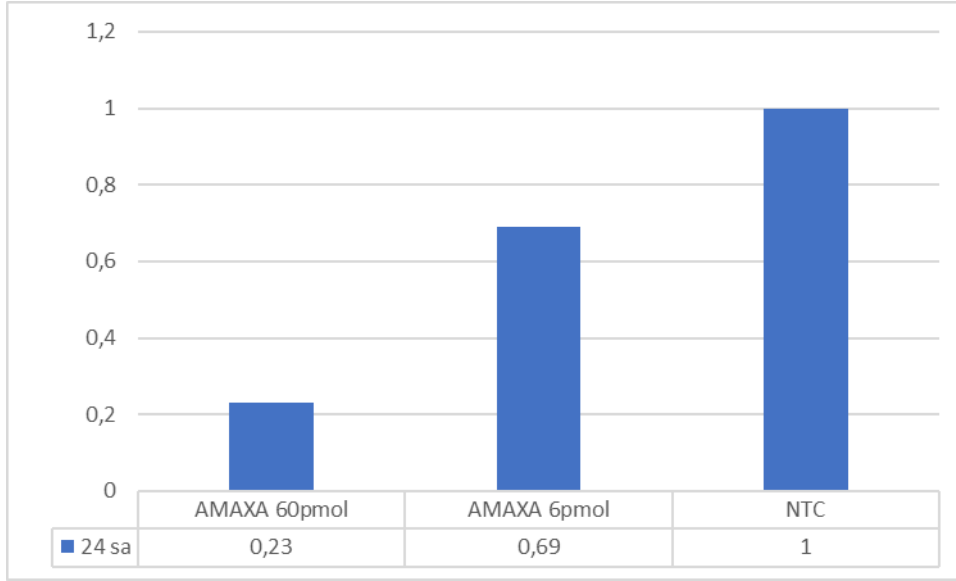
Lipozomal ajanla yapılan optimizasyon deneylerinin sonrasında deney grubu çalışmalarına geçildiğinde yapılan qRT-PZR sonucu $\Delta\Delta C_t$ metodu ile analiz edildi. İnkübasyon süresi olarak belirlenen 3 saat diliminde de 15 pmol siRNA uygulamasında gen anlatımının baskılanmasında anlamlı bir oranı bulunamadı. Baskılanma oranı 24 saatte yaklaşık %10 ve 48 saatte %7 oranında bulundu. 72 saat inkübasyon sonunda ise gen ifadesinde baskılanma olmadığı bulundu. (Şekil 4-2)



Şekil 4-2: Farklı sürelerde lipozomal ajanla yapılan siRNA baskılanma oranları

4.1.2. Elektroporasyon yöntemiyle yapılan optimizasyon deneyi sonuçları

Hücrelere verilmesi gereken siRNA oranını bulmak için deney gruplarına 6 ve 60 pmol siRNA verildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından yapılan qRT-PZR sonucu $\Delta\Delta C_t$ metodu ile analiz edildiğinde 6 pmol verilen grupta %30 oranında baskılama oranı bulunurken 60 pmol verilen grupta %77 oranında baskılanma tespit edildi. (Şekil 4-3)



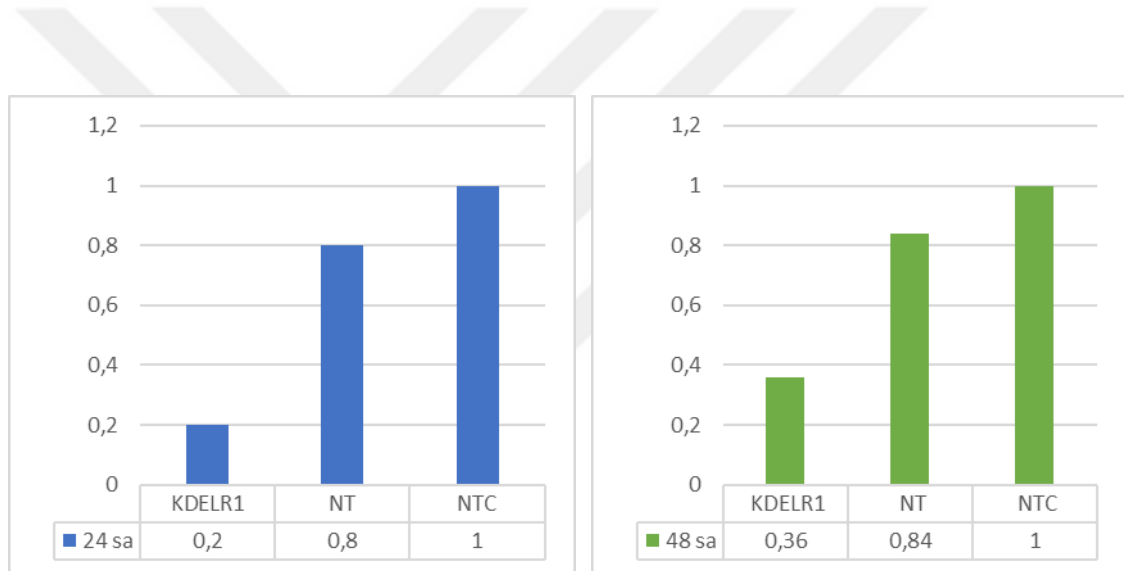
Şekil 4-3: Elektroporasyonla yapılan farklı siRNA miktarlarında baskılamaları

Tablo 4-1: Optimizasyon deneylerinde KDEL R1 gen ifadesi baskılanma oranları

Uygulama Yöntemi	siRNA Miktarı	Baskılanma Oranı
Lipofectamine 2000	5 pmol	-
	10 pmol	%7
	15 pmol	%66,8
Elektroporasyon	6 pmol	%30
	60 pmol	%77

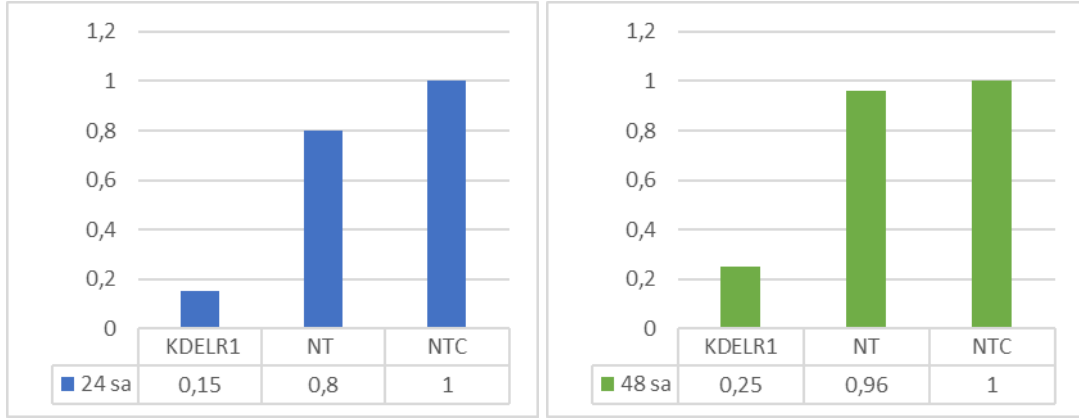
4.2. Deney gruplarında baskılanma oranları

U266 hücreleri ve RPMI8226 hücrelerine 60 pmol siRNA uygulamasının ardından 24 ve 48 saat sürelerinin sonunda hücreler toplandı. İlk olarak hücrelerden total RNA elde edildi ardından cDNA sentezi gerçekleştirildi. KDELR1 siRNA, NT siRNA ve NTC gruplarının 24 ve 48 saatlik örnekleri ile KDELR1 geni ve referans gen olarak seçilen TBP için qRT-PZR yapıldı. Tüm gruplar ikili kopya olarak çalışıldı. $\Delta\Delta C_t$ metoduna göre analizler yapıldı ve grupların baskılanma oranları belirlendi. U266B1 hücrelerinde KDELR1 siRNA grubunda kontrol grubuna göre 24 saatte %80 oranında KDELR1 gen ifadesinin baskılandığı bulundu. 48 saat grubunda ise 24 saatte baskılanma oranı %74 olarak bulundu. (Şekil 4-4)



Şekil 4-4: U266 hücrelerinin 24 ve 48 saat KDELR1 gen ifadesi sonuçları

RPMI8226 hücrelerinde yapılan qRT-PZR sonucunda $\Delta\Delta C_t$ metodu ile analiz yapıldı. Sonuçlarda siRNA grubunda kontrol grubuna göre 24 saatte %85 oranında KDELR1 gen ifadesinin baskılandığı bulundu. 48 saat grubunda ise baskılanma oranı %75 olarak bulundu. (Şekil 4-5)



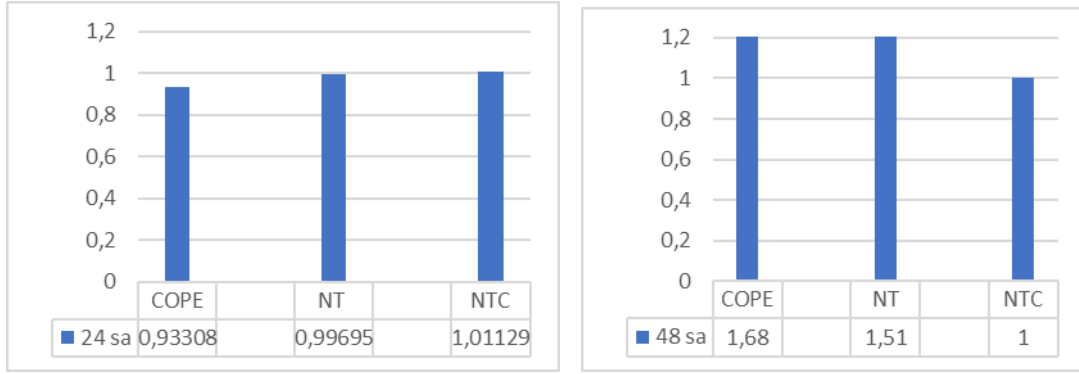
Şekil 4-5: RPMI8226 hücrelerinde KDELR1 gen ifadesi sonuçları

Tablo 4-2: U266 ve RPMI8226 hücrelerinde KDELR1 baskılanma oranları

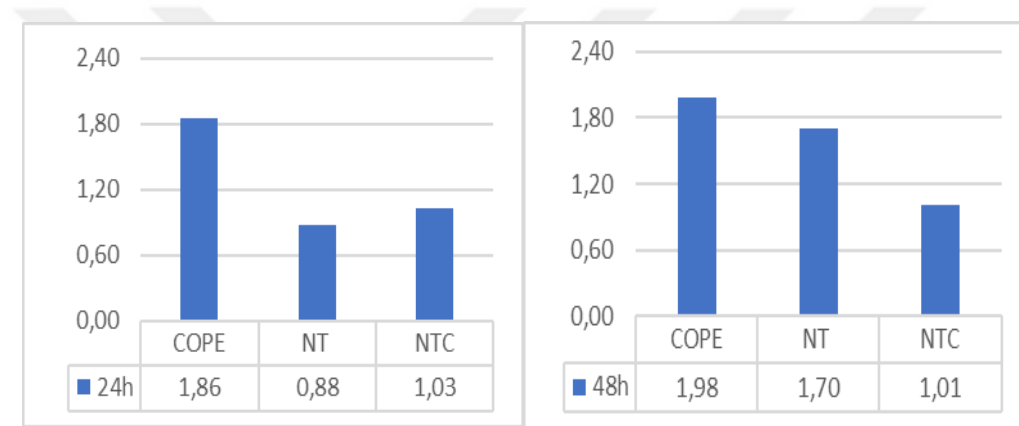
Hücre Hattı	Zaman Dilimi	Baskılanma Oranı
U266	24 saat	%80
	48 saat	%74
RPMI8226	24 saat	%85
	48 saat	%75

4.3. Deney gruplarında COPE geninin qRT-PZR sonuçları

Kullanılan iki hücre hattında da 24 ve 48 saatlerin cDNA'larından COPE geninin kantitatif değişimini ölçmek için qRT-PZR yapıldı. KDELR1 siRNA transfeksiyonu yapılan gruplar ile NTC gruplarında COPE geninin anlatım seviyelerinin değişimi $\Delta\Delta C_t$ metodu ile hesaplandı. RPMI8226 hücrelerinde yapılan analiz sonucunda 24 ve 48 saatlerde anlamlı COPE gen anlatımında kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim bulunmadı. (Şekil 4-6) U266 hücrelerinde yapılan analiz sonucunda 24 ve 48 saat grubunda KDELR1 siRNA uygulanan grupta kontrol grubuna göre COPE geninin anlatımının arttığı bulundu. 24 saat diliminde COPE gen anlatımının kantitatif olarak NTC grubuna göre anlatımının yaklaşık 1,8 kat arttığı belirlendi. (Şekil 4-7)



Şekil 4-6: RPMI 8226 hücrelerinde COPE gen ifadesi sonuçları



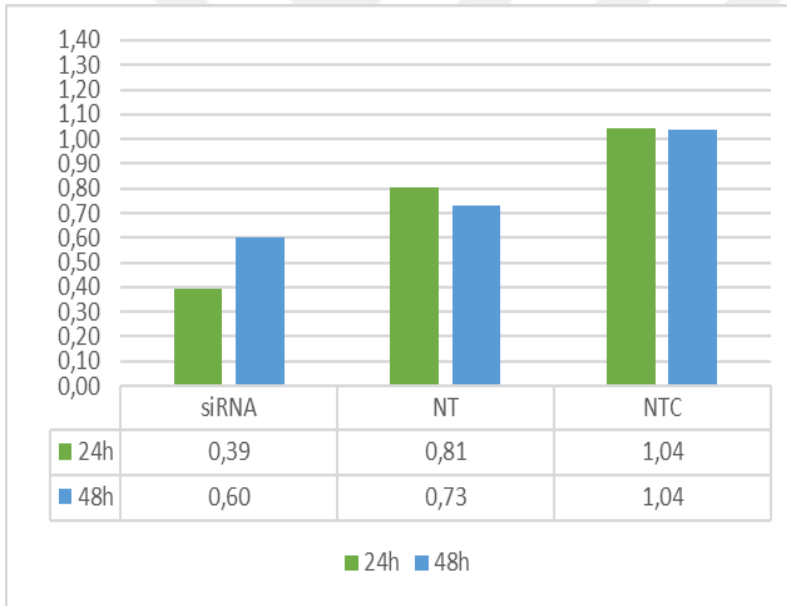
Şekil 4-7: U266 hücrelerinde COPE gen ifadesi sonuçları

4.4. MTT testi sonuçları

MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolyum bromür) testinin genel amacı, ayrıntılı hücre sayımına gerek kalmadan canlı hücreleri ölçmektir. MTT testinde, çoğu canlı hücre için mitokondriyal aktivitenin sabit olması temel alınmaktadır. Canlı hücre sayısındaki artış veya azalış mitokondriyal aktivite ile lineer olarak ilişkilidir. Hücrelerin mitokondriyal aktivitesi, sarı renkte tetrazolyum tuzu olan MTT'nin homojen ölçüm için mitokondriyal redüktazın etkisi ile formazan kristallerine dönüştürülmesiyle ölçülür (55,56).

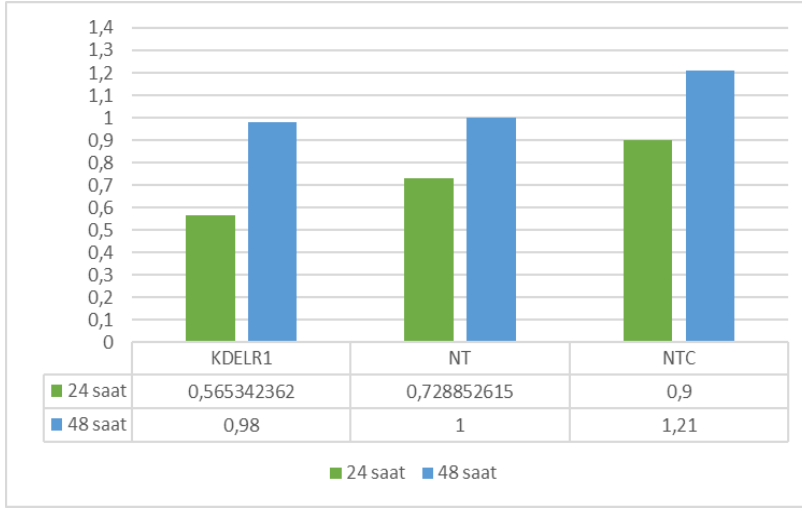
İnkübasyon süreleri sonunda MTT ajanına maruz bırakılan U266 ve RPMI8226 hücreleri Multiskan Spektrum cihazında 540nm’de absorbans (OD) değerleri ölçüldü. 24 ve 48 saat olarak belirlenen iki inkübasyon süresinde çalışıldı. (Şekil 4-10 ve Şekil 4-11) Ölçüm sonucunda, OD değerlerinin her deney grubu için ortalaması alınarak hesaplama yapıldı.

Elde edilen sonuçlarda U266 hücre hattında 24 saat KDELR1 siRNA uygulanan gruplarda hücre canlılığının azaldı görüldü. 48 saatlik inkübasyonun sonucunda yapılan ölçümlerde gruplar arasında farkların azaldığı görüldü. U266 hücrelerinin transfeksiyondan 24 saat sonra proliferasyonun kontrol grubuna göre %62,5 azaldığı belirlendi. 48 saatin sonunda ise bu oran yaklaşık %40 olarak saptandı. RPMI8226 hücrelerinde siRNA transfeksiyonundan sonra yapılan analizlerde hücre proliferasyonunun U266 hücrelerine kıyasla daha az oranda azaldığı görüldü.(Şekil 4-8)

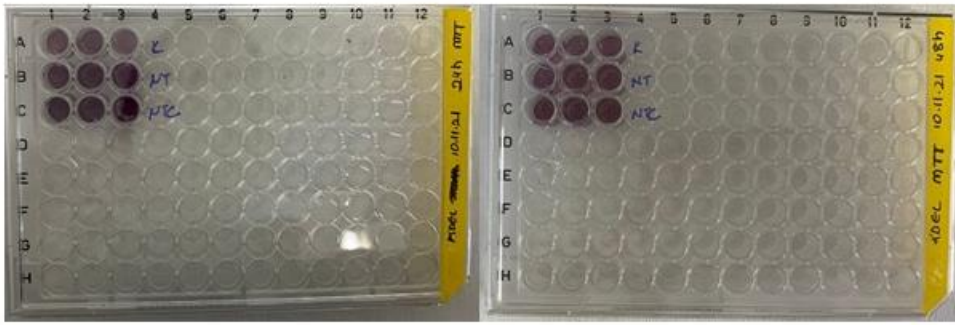


Şekil 4-8: U266 hücreleri MTT deneyi proliferasyon sonuçları

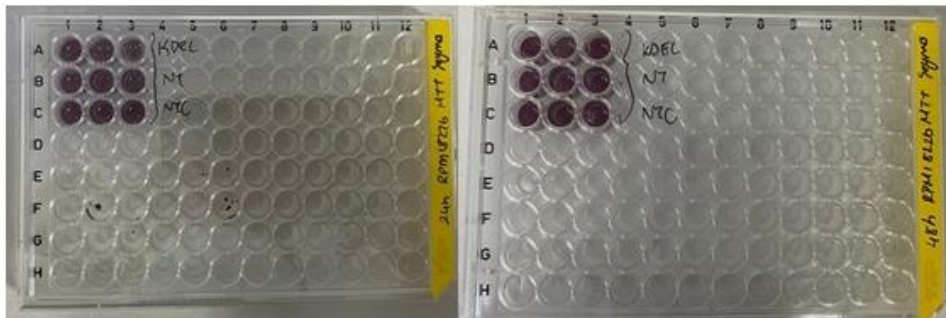
Hücre proliferasyonunun RPMI8226 hücrelerinde 24 saatte kontrol grubuna göre %37,7 olarak azaldığı bulundu. 48 saat diliminde ise gruplar arasında anlamlı bir değişim belirlenmedi. (Şekil 4-9)



Şekil 4-9: RPMI8226 hücreleri MTT deneyi proliferasyon sonuçları



Şekil 4-10: U266 hücreleri 24 ve 48 saat MTT deneyleri



Şekil 4-11: RPMI8226 hücreleri 24 ve 48 saat MTT deneyleri

4.5. Apoptoz tayin sonuçları

Apoptoz tayininde 3 farklı boya kullanıldı. Görüntüleme işlemleri Konfokal Lazer taramalı mikroskop ile 3 ayrı kanaldan yapıldı. Canlı hücreler mikroskopta mavi , apoptotik hücreler yeşil ve nekrotik hücreler kırmızı renkte görüntülendi.10x büyütme yapılarak farklı alanlardan görüntüler alındı.3 kanal için ayrı görüntü ve birleşimi içinde ayrı görüntüler alındı. KDELR1 siRNA grubunda NTC grubuna göre mavi renkte görünen canlı hücrelerin çaplarının küçüldüğü ve şekillerinin değiştiği görüldü.

Her kanaldan alınan görüntülerden deney grupları için ayrı ayrı hücre sayımı yapıldı. Hücre sayımı Image J programında yapıldı ve elde edilen sayısal değerler excell dosyasına aktarıldı. İki hücre hattı için tüm sayımlar bittikten sonra deney grupları arasındaki hücre sayıları birbirine oranlanarak hesaplandı. Böylece apoptotik, nekrotik ve canlı hücreler oransal olarak belirendi.

Yapılan hesaplamalar sonucundaki yüzde değerler iki hücre hattı içinde tablo halinde özetlenmiştir. Elde edilen veriler sonucunda U266 hücrelerinde 24 saat grubunda KDELR1 siRNA grubunda apoptotik total hücre oranı %76 olarak bulundu. 48 saat diliminde de benzer şekilde apoptotik hücrelerin oranı %70 olarak hesaplandı. (Tablo 4-3)

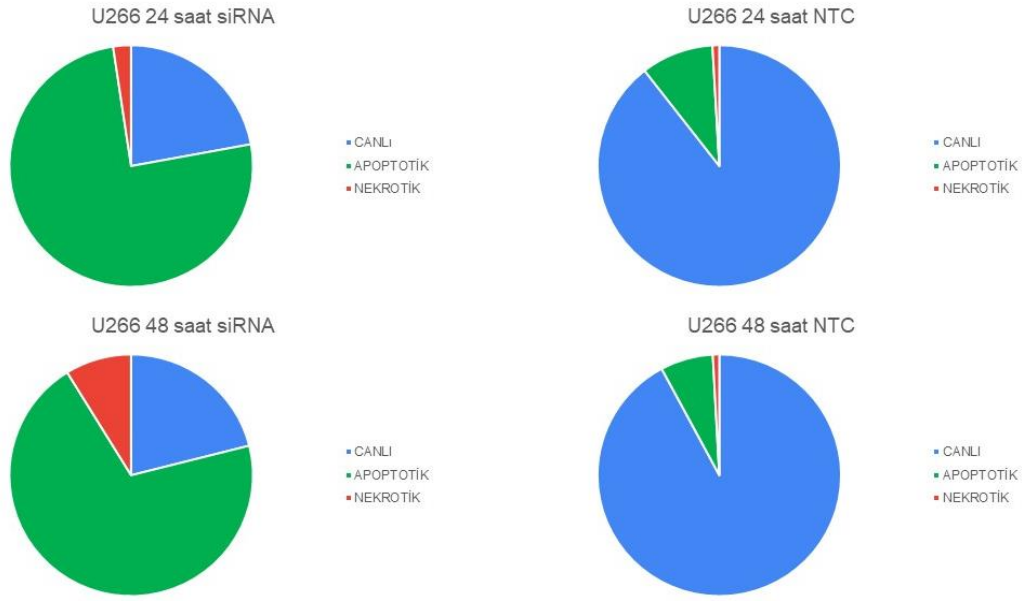
Tablo 4-3: U266 hücreleri apoptoz deneyi hücre oranları

U266	Deney Grupları	Canlı Hücre Oranları	Apoptotik Hücre Oranları	Nekrotik Hücre Oranları
24 SAAT	KDELR1 siRNA	22%	76%	2%
	NTC	89%	10%	1%
48 SAAT	KDELR1 siRNA	21%	70%	9%
	NTC	92%	7%	1%

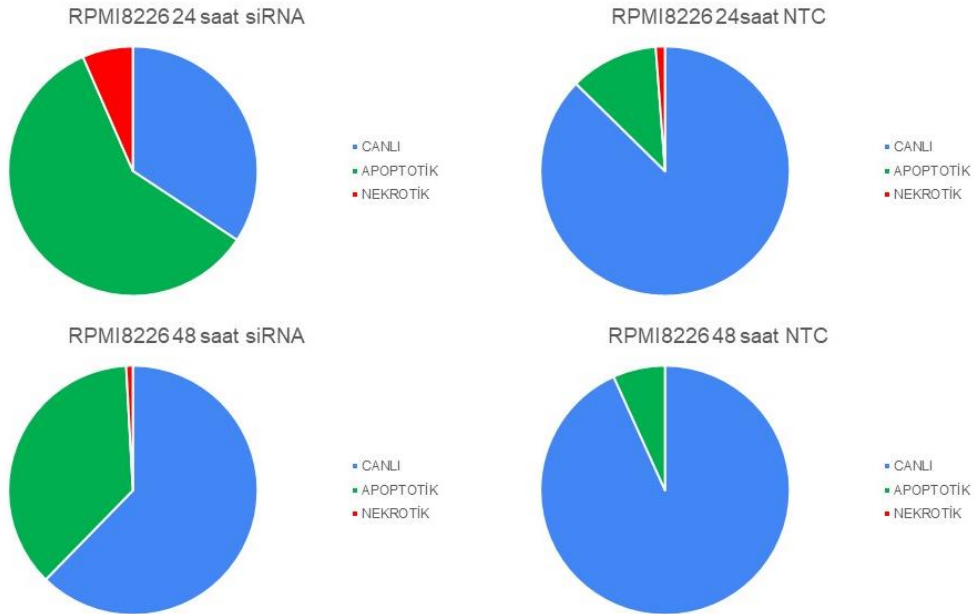
Yapılan hesaplamalar sonucunda RPMI8226 hücrelerinde 24 saatte KDELR1 grubunda apoptotik hücre total hücrelerin %59 olarak bulunurken 48 saat diliminde de benzer şekilde apoptotik hücreler %37 oranında bulundu. (Tablo 4-4)

Tablo 4-4: RPMI8226 hücreleri apoptoz deneyi hücre oranları

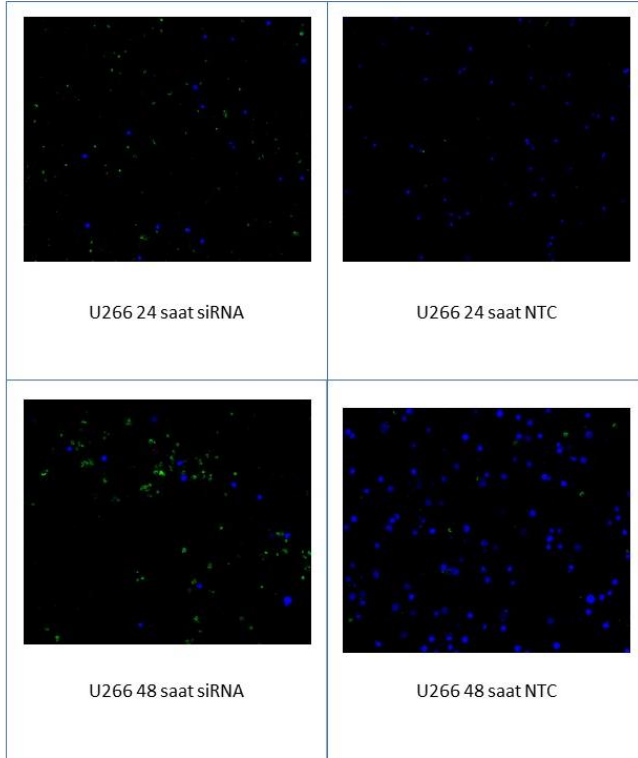
RPMI8226	Deney Grupları	Canlı Hücre Oranları	Apoptotik Hücre Oranları	Nekrotik Hücre Oranları
24 SAAT	KDELR1 siRNA	34%	59%	7%
	NTC	87%	11%	1%
48 SAAT	KDELR1 siRNA	62%	37%	1%
	NTC	93%	7%	-



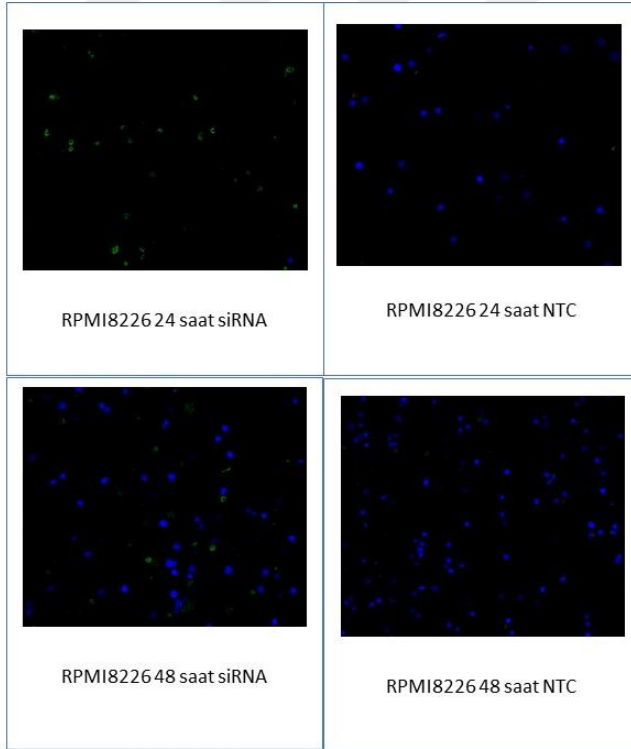
Şekil 4-12: U266 hücreleri apoptoz deneyi sonuçları pasta grafiği



Şekil 4-13: RPMI8226 hücreleri apoptoz deneyi sonuçları pasta grafiği



Şekil 4-14: U266 hücreleri apoptoz deneyi konfokal mikroskop görüntüleri



Şekil 4-15: RPMI8226 hücreleri apoptoz deneyi konfokal mikroskop görüntüleri

5. TARTIŞMA

MM plazma hücrelerinin malign transformasyonu sonucunda oluşan hematolojik bir malignitedir. Hastalığın ara formu olan MGUS ve SMM deki hücrelerde gerçekleşen bir çok genetik bozulmalar sonucu daha malign karakterli myeloma hücreleri oluşmaktadır. MM plazma hücrelerinin bozukluğu olsada kemik iliği mikroçevresi hastalığın ilerlemesini ve tümör hücrelerinin sağkalımını artırır. Hastalığa sebep olan ve hastalığın ilerlemesine katkıda bulunan genetik ve epigenetik mekanizmalarla ilgili bir çok çalışma mevcuttur. Yinede tam olarak aydınlatılamayan bir çok gen ve yolak etkileşimleri vardır. Genetik tekniklerin ilerlemesiyle birlikte MM’da tedavi, ilaç direnci ve patogenezi ile ilgili bir çok çalışma devam etmektedir.

Daha önce laboratuvarımızda yapılan transkriptom çalışmasında tanı almış ve tedavi görmemiş MM hastalarının kemik iliği örneklerinde RPKM (*Reads Per Kilobase Million*) değerleri elde edilmiştir. Bu veri sağlıklı kontrol ile karşılaştırıldığında daha fazla eksprese olan aday genler belirlenmiştir. Bu aday genlerin yüksek ekspresyonunun konfirmasyonu yeni tanı almış ve tedavi görmemiş MM hastalarında ve MGUS tanılı hastalarda yapılmıştır. KDELR1 geni ve COPE geni hem transkriptom datasından yapılan biyoinformatik analiz sonucu hem de hasta RNA’larından yapılan ekspresyon çalışması sonucunda sağlıklı kontrollere göre yüksek oranda eksprese edildiği tespit edilmiştir (57,58). Bu genlerin, özellikle KDELR1’in, MM patogenezindeki rolünü anlamak amacıyla 2 farklı MM hücre hattı olan U266 ve RPMI 8226 hücrelerinde fonksiyonel çalışma yapılmıştır. KDELR1 geninin 2 hücre soyundada gen anlatımı incelenmiştir. Amacımız; KDELR1 gen eksikliğinde hücrede meydana gelen değişimleri araştırmaktır.

KDELR1 geni ile ilgili literatürde çeşitli çalışmalar mevcuttur. KDELR1, KDELR dizisine sahip proteinleri tanır ve COPI ile etkileşime girerek proteinlerin ER’ye taşınmalarını sağlar. COPE geni, COPI kompleksinin epsilon alt birimidir. Önceki çalışmamızda MM hastalarında ekspresyonu arttığı bulunan COPE geninin , KDELR1 gen yokluğunda ekspresyon seviyesindeki değişime bakıldı. qRT-PZR yöntemi ile siRNA ve kontrol grubu arasındaki ekspresyon seviyesi $\Delta\Delta C_t$ metodu ile hesaplandı. RPMI8226 hücrelerinde KDELR1 yokluğunun 24 ve 48 saat diliminde COPE gen ekspresyon seviyesi üzerinde bir etkisi olmadığı bulundu.

U266 hücrelerinde 24 saatte kontrol grubu karşılaştırıldığında siRNA grubunda, COPE gen ekspresyon seviyesinin yaklaşık 1,8 kat arttığı görüldü. COPE geninin ekspresyon seviyesindeki artışın, bu gen ile etkileşimde olan diğer genler tarafından düzenlendiğini düşünmekteyiz. U266 hücrelerinde 48 saat sonunda kontrol grubu ile siRNA grubu arasında COPE gen ekspresyon seviyesinde anlamlı değişim bulunmadı.

siRNA yöntemi ile KDELR1 genini susuturduğumuz örneklerle sırasıyla MTT ve apapotoz analizi yaptık. KDELR1 yokluğunda U266 ve RPMI8226 hücrelerinin canlılığındaki değişim belirlendi. U266 hücrelerinde 24 saat inkübasyon sonunda siRNA grubunda kontrol grubuna göre hücre canlılığının yaklaşık %62,5 oranında 48 saat diliminde %40 azaldığı belirlendi. RPMI8226 hücrelerinde 24 saat inkübasyon sonunda siRNA grubunda kontrol grubuna göre hücre canlılığının yaklaşık %37,7 oranında azaldığı ve 48 saat diliminde ise hücre canlılığının gruplar arasında değişmediği tespit edildi. Tüm bu sonuçlar ele alındığında her iki hücre hattında da 48 saat diliminde siRNA grubunda hücre canlılığında artış gözlenmiştir. Bu durum, siRNA'nın gen üzerindeki etkisinin 48.saatte azalmasından kaynaklandığını gösterir. İki hücre hattında canlılık oranının farklı olması KDELR1 gen fonksiyonunun hücreler arasında değişken olabileceğini göstermektedir. Sonuçlarımız KDELR1 yokluğunun, MM hücrelerinin proliferasyonunu azalttığını göstermektedir.

Apoptoz, hücre çekirdeğinin parçalanması, kromatin yoğunlaşması ve kromozomal DNA parçalanması ile karakterize edilen programlanmış hücre ölümüdür (59). Tümör hücrelerinin apoptozu baskılamak için kullandığı çeşitli moleküler mekanizmalar sonucu hücreler bölünmeye ve büyümeye devam etmektedirler (60).

KDELR1 geni yokluğunun MM hücrelerinin apoptozu indükleyip indüklediğini belirlemek amacıyla hücreler floresan boyalar ile boyanarak konfokal lazer taramalı mikroskopta görüntülendi. U266 hücrelerinde siRNA grubunda apoptotik hücre 24 saatte yaklaşık %76 ve 48 saatte %70 oranında bulundu. RPMI8226 hücrelerinde siRNA grubunun apoptotik hücre oranı 24 saatte yaklaşık %59 ve 48 saatte %37 oranında bulundu.

Bu değerler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında apoptozun tetiklendiği görüldü. İki hücre hattı arasında apoptotik hücre oranları arasında fark olsa da KDEL R1 geninin yokluğunun MM hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca konfokal lazer taramalı mikroskop görüntülemelerinde siRNA grubundaki hücrelerin kontrol grubu hücrelerine göre boyutlarının daha küçük olduğu g r lm ştir.

Apoptoza sebep olan birden çok mekanizma ve yolak vardır (60). Bu bilgilerle hareketle hücrede hangi yolların etkilenecek apoptozun indüklendiği sonraki  alışmlarA   nc  olacaktır. Tümör hücreleri, proliferasyon, g   ve farklılaşmayı sağlamak için protein sentezi artmaktadır. KDEL reseptörlerindeki artış, protein katlanması, modifikasyonu ve taşınmasına yardımcı olmak için gerekli ER yerleşik proteinlerinin ER lümeni içinde tutulmasını sağlayarak tümör hücrelerine fayda sağlayabilir (45). MM hücre hatlarında KDEL R1 gen eksikliğinde elde ettiğimiz sonuçlar bu hipotezi destekler niteliktedir.

KDEL R1'in fonksiyonunu anlamak üzere HAP-1 hücrelerinde CRISPR/Cas tekniği ile gen nakavtı yapılmış. Transkriptom datası elde edilerek KDEL R1 yokluğunda ciddi hücresel bozukluklara sebep olan ve hücre yapışması, ekstraselüler matriks bileşenlerinde yer alan 300'den fazla gen belirlenmiştir. Yapışma deneyleri yapıldığında KDEL R1 olmayan hücrelerde yapışmanın neredeyse 2 kat arttığını gösterilmiştir. Hücresel homeostazın KDEL R1 yokluğunda bozulduğunu ve ER stres koşulları altında hücre canlılığının azaldığı tespit edilmiştir (61). Bu sonuçlar bizim çalışmamız ile uyumludur.

KDEL reseptörünün şaperonları, protein katlanması gibi önemli rollere sahiptir. 2020 yılında yapılan çalışmada; UPR sırasında KDEL reseptörlerinin hücre tepkisini anlamak için, tunikamisin ile ER stres indüklenmiş ve KDEL R1, KDEL R2 ve KDEL R3 genlerinin ekspresyon seviyesi, yukarı regülasyon göstermiştir (62).

HeLa hücrelerinde yapışan çalışmada; ER stres yanıtının p38 MAP kinazlarının ve c-Jun amino-terminal kinazlarının (JNK'ler) aktive ettiği ve mutant KDEL reseptörünün p38 ve JNK1 aktivasyonunu baskıladığı bulunmuştur. KDEL reseptörünün aktivasyonunun p38 MAP kinazlarının fosforilasyonunu indüklediğini de bulunmuştur. Bu sonuçlar, KDEL reseptörünün ER stres yanıtına preoteinleri yalnızca geri alma yeteneğiyle değil, aynı zamanda MAP kinaz sinyal yolağını modüle ederek de katıldığını göstermektedir (63).

Bu sebeple KDEL R1 MAP kinaz yolağı üzerinden hücre proliferasyonuna etki etmekte olup bizim sonuçlarımızı destekler niteliktedir. Mezensefalik astrosit kaynaklı nörotrofik faktör (MANF), bir ERS'ye sahip ER strese duyarlı bir proteindir. Henderson ve arkadaşları 2013 yılında, ER kalsiyum tükenmesinin hücre yüzeyinde KDEL reseptör ekspresyonunu arttırdığını ve hücre yüzeyindeki KDEL reseptörleri ile MANF etkileşiminin olduğunu göstermiştir. Hücre yüzeyindeki KDEL R'lerin, hücre zarında stres halindeki komşu hücrelerden salgılanan KDEL R ligandlarının bağlanması yoluyla hücre-hücre iletişimine de dahil olduğu görülmektedir (64).

Bauer A. ve arkadaşları, 2020 yılındaki çalışmalarında canlı hücre görüntüleme yoluyla fare ve farklı insan hücre hatlarının plazma membranında KDEL reseptör kümelenmesini incelemiştir. Küme oluşumunun türden bağımsız olduğunu göstermişlerdir. Ancak hücre tipleri arasında farklılıkların olduğunu belirtmişlerdir. Her iki türden makrofaj hücre hatları için küme oluşumu gözlemlenmezken, fibroblast fare hücreleri gibi diğer kümelerin benzer bir şekilde geliştiğı göstermişlerdir (65).

Tapia ve arkadaşlarının 2019'da yaptığı çalışmada, KDEL R1'in ligandı ile uyarılmasının, protein kinaz A'ya (PKA) bağımlı bir şekilde lizozomların perinükleer alana taşınmasına yol açtığını göstermişlerdir. KDEL R1'in, *DynLRB1* fosforile eden ve lizozomların Golgi'ye yer değiştirmesine yol açan Gs/PKA yolunu aktive ettiğı gösterilmiş. KDEL reseptörünün, lizozom yer değiştirmesi ve lipit damlacık dönüşümünün otofajiye bağılı modülasyonu ile salgılamayı düzenlediğı gösterilmiştir (66).

Mcf-7 hücre hatları kullanılarak yapılan bir çalışmada; KDEL R'nin 3 izofromunda hücre yüzeyinde eksprese edildiğı gösterilmiştir. Hücre dışı ortamdan gelen sinyalleri kullanarak hücresel homeostazın korunmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Sonuçlar yüzeyde ifade edilen KDEL R1'in hem hızlı hem de yavaş geri dönüşümlü endozomları içeren endolizozomal bölme ve Golgi aracılığıyla oldukça karmaşık geri dönüşüm yollarından geçtiğı gösterilmiştir (67).

KDELRL1'in farklı bir yönünü ortaya çıkaran bir başka çalışmada ise mutant bir fare hattı kullanılmıştır. *naive T* hücrelerinde yapılan bu çalışmada KDELRL1 geninin PP1 aktivitesi yoluyla entegre stres yanıtını kontrol ederek T hücre homeostazını düzenlediği gösterilmiştir (68).

Melonamada, genetik olarak tasarlanmış bir fare modeli kullanılarak melanoblast transkriptom veri seti oluşturulmuştur. Bu veri setinden elde edilen 43 imza genden metastaza etkisini belirlemek amacıyla KDELRL1 ve KDELRL3 genine siRNA uygulaması gerçekleştirilmiş. KDELRL3 gen kaybında deneysel olarak metastazı bozduğu bulunurken tam tersi bir etki olarak KDELRL1 gen kaybının metastazı arttırdığı ortaya çıkmıştır (69). KDELRL1 geninin bizim çalışmamızın aksine melanomada metastaz baskılayıcı olduğunu göstermektedir. Bazı durumlarda, KDELRL3 geninde olduğu gibi farklı kanserlerde aynı gen farklı etki göstermekle açıklanabilir (70, 71).

MM monoklonal immünoglobulinini yani paraproteini aşırı üretir. Yüksek düzeyde protein üretimi, ER stresini indükler ve ER stresinin neden olduğu hücre ölümünü önlemek için paraprotein'in proteazomlarda ubiquitin ile işaretlenerek küçük ünitelere ayrılır. Paraprotein'in sürekli ve aşırı üretimi sonucunda hücrede katlanmamış protein cevabı (UPR) oluşur (72). Sürekli ER stresine durumunda hücre kendini koruma mekanizmaları (şaperon protein üretimi gibi) devreye sokar bu sayede hayatta kalır ancak çözemediği durumlarda apoptoza gider (73).

Literatürdeki çalışmalarda da gösterildiği gibi KDELRL1 geninin hücre stres koşulları altında hücre homeostazını düzenlediği ve farklı hücrelerde farklı etkinlikleri olduğunu görmekteyiz. Sürekli ER stresine maruz kalan MM'de hücre homeostazını sağlamada KDELRL1'in önemli bir işlevi olabilir. Çalışmamız sonucu KDELRL1 yokluğunda hücrelerin canlılığının azalması ve apoptoza gitmeleri de bu durumu destekler niteliktedir.

Sonuç olarak, MM'de KDELRL1 gen eksikliği sonucunda COPE geninin anlatım seviyesinin arttığı, hücrelerin proliferasyonunun azaldığı ve apoptoza gittikleri düşünülmektedir. Bu sonuçlar daha önce laboratuvarımızda yapılan transkriptom çalışmalarımızdan elde ettiğimiz verilerle uyumludur. MM'de ekspresyonunun arttığını bulduğumuz KDELRL1 geninin yokluğunun anti-tümör etkisi olabilir. İlgili gen ve yolların ileride yapılacak olan çalışmalar ile aydınlanacaktır. Bu tez çalışması MM U266 ve RPMI8226 hücre hatlarında KDELRL1 geninin spesifik olarak araştırıldığı ilk çalışmadır.

KAYNAKLAR

1. Wilson CS. Chapter 5 *The Plasma Cell Dyscrasias*. Boston, MA, Springer US,2004
2. Shapiro-Shelef M, Calame K. Plasma cell differentiation and multiple myeloma. *Curr Opin Immunol*. 2004;16(2):226–34.
3. Soh KT, Tario JD, Wallace PK. Diagnosis of Plasma Cell Dyscrasias and Monitoring of Minimal Residual Disease by Multiparametric Flow Cytometry. *Clin Lab Med [Internet]*. 2017;37(4):821–53.
4. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(3):160–71.
5. Kyle RA. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. Natural history in 241 cases. *Am J Med*. 1978;64(5):814–26.
6. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol [Internet]*. 2014;15(12):e538–48. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70442-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70442-5)
7. Karger S. Plasma cell dyscrasias. *Acta Haematol*. 1982;68(3):165–6.
8. Mouhieddine TH, Weeks LD, Ghobrial IM. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 2019;133(23):2484–94.
9. Rajkumar SV, Landgren O, Mateos MV. Smoldering multiple myeloma. *Blood*. 2015;125(20):3069–75.
10. Ho M, Patel A, Goh CY, Moscovin M, Zhang L, Bianchi G. Changing paradigms in diagnosis and treatment of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM). *Leukemia [Internet]*. 2020;34(12):3111–25.
11. Hultcrantz M, Land O. Genomic Landscape and Mechanisms of Disease Evolution and Progression in Multiple Myeloma. *Ajho*. 2017;13(12):19–25.
12. Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, Van Duin M, Sonneveld P, Mateos MV, et al. Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Prim* . 2017;3:1–20.

13. Barwick BG, Gupta VA, Vertino PM, Boise LH. Cell of origin and genetic alterations in the pathogenesis of multiple myeloma. *Front Immunol.* 2019;10(MAY).
14. Castaneda O, Baz R. Multiple Myeloma Genomics - A Concise Review. *Acta Med Acad.* 2019;48(1):57–67.
15. L M, CP T. Data-Driven Statistical Modeling and Analysis of the Survival Times of Multiple Myeloma Cancer. *Heal Sci J.* 2020;14(1):1–11.
16. Kazandjian D. Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy. *Semin Oncol.* 2016;43(6):676–81.
17. Medical CME. ORIGINAL Haematology : multiple myeloma. 2019;2019.
18. Padala SA, Barsouk A, Barsouk A, Rawla P, Vakiti A, Kolhe R, et al. Epidemiology, Staging, and Management of Multiple Myeloma. *Med Sci.* 2021;9(1):3.
19. Dowling M, Kelly M, Meenaghan T. Multiple myeloma: Managing a complex blood cancer. *Br J Nurs.* 2016;25(16):S18–28.
20. Brigle K, Rogers B. Pathobiology and Diagnosis of Multiple Myeloma. *Semin Oncol Nurs.* 2017;33(3):225–36.
21. Neuse CJ, Lomas OC, Schliemann C, Shen YJ, Manier S, Bustoros M, et al. Genome instability in multiple myeloma [Internet]. Vol. 34, *Leukemia*. Springer US; 2020. p. 2887–97.
22. Fairfield H, Falank C, Avery L, Reagan MR. Multiple myeloma in the marrow: Pathogenesis and treatments. *Ann N Y Acad Sci.* 2016;1364(1):32–51.
23. Lomas OC, Tahri S, Ghobrial IM. The microenvironment in myeloma. *Curr Opin Oncol.* 2020;32(2):170–5.
24. van de Donk NWCJ, Pawlyn C, Yong KL. Multiple myeloma. *Lancet* [Internet]. 2021;397(10272):410–27.
25. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol.* 2020;95(5):548–67.
26. Rajkumar SV, Kumar S. Multiple myeloma current treatment algorithms. *Blood Cancer J* 2020;10(9).
27. Rajkumar SV. Multiple myeloma: Every year a new standard? *Hematol Oncol.* 2019;37(S1):62–5.

28. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised international staging system for multiple myeloma: A report from international myeloma working group. *J Clin Oncol*. 2015;33(26):2863–9.
29. Pevzner. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav*. 2017;176(3):139–48.
30. Béthune J, Wieland FT. Assembly of COPI and COPII Vesicular Coat Proteins on Membranes. *Annu Rev Biophys*. 2018;47(January):63–83.
31. Jackson LP. Structure and mechanism of COPI vesicle biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2014;29(1):67–73.
32. GeneCARDS®, The Human Gene Database, COPE, 2021.
<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=COPE&keywords=COPE>
33. Dodonova SO, Diestelkoetter-Bachert P, Von Appen A, Hagen WJH, Beck R, Beck M, et al. A structure of the COPI coat and the role of coat proteins in membrane vesicle assembly. *Science* (80-). 2015;349(6244):195–8.
34. Maruyama S, Miyajima N, Bohgaki M, Tsukiyama T, Shigemura M, Nonomura K, et al. Ubiquitylation of ϵ -COP by PIRH2 and regulation of the secretion of PSA. *Mol Cell Biochem*. 2008;307(1–2):73–82.
35. Chen S, Chen N, Miao B, Peng J, Zhang X, Chen C, et al. Coatomer protein COPE, a novel NS1-interacting protein, promotes the replication of Porcine Parvovirus via attenuation of the production of type I interferon. *Vet Microbiol* [Internet]. 2021;261(May):109188.
36. Matsumura T, Terada J, Kinoshita T, Sakurai Y, Yahaba M, Ema R, et al. Circulating Anti-Coatomer Protein Complex Subunit Epsilon (COPE) autoantibodies as a potential biomarker for cardiovascular and cerebrovascular events in patients with obstructive sleep apnea. *J Clin Sleep Med*. 2017;13(3):393–400.
37. Beck R, Ravet M, Wieland FT, Cassel D. The COPI system: Molecular mechanisms and function. *FEBS Lett*. 2009;583(17):2701–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2009.07.032>
38. Dancourt J, Barlowe C. Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Annu Rev Biochem*. 2010;79:777–802.

39. Capitani M, Sallese M. The KDEL receptor: New functions for an old protein. *FEBS Lett* [Internet]. 2009;583(23):3863–71
40. Raykhel I, Alanen H, Salo K, Jurvansuu J, Van DN, Latva-Ranta M, et al. A molecular specificity code for the three mammalian KDEL receptors. *J Cell Biol.* 2007;179(6):1193–204.
41. Lewis MJ, Pelham HRB. A human homologue of the yeast HDEL receptor. Vol. 348, *Nature*. 1990. p. 162–3.
42. GeneCARDS[®], The Human Gene Database, KDELR1, 2021.
<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KDELR1&keywords=kdelr1>
43. Giannotta M, Fragassi G, Tamburro A, Vanessa C, Luini A, Sallese M. Prohibitin: A novel molecular player in KDEL receptor signalling. *Biomed Res Int.* 2015;2015.
44. Bräuer P, Parker JL, Gerondopoulos A, Zimmermann I, Seeger MA, Barr FA, et al. Structural basis for pH-dependent retrieval of ER proteins from the Golgi by the KDEL receptor. *Science* (80-). 2019;363(6431):1103–7.
45. Wires ES, Trychta KA, Kennedy LM, Harvey BK. The function of kdel receptors as upr genes in disease. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11).
46. Tsai YL, Ha DP, Zhao H, Carlos AJ, Wei S, Pun TK, et al. Endoplasmic reticulum stress activates SRC, relocating chaperones to the cell surface where GRP78/CD109 blocks TGF- β signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(18):E4245–54.
47. Munro S, Pelham HR. Munro , S . & Pelham , H . R . A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins . *Cell A C-Terminal Signal Prevents Secretion Luminal ER Proteins. Cell.* 1987;48,:899–907.
48. Trychta KA, Henderson MJ, Harvey BK. Proteome under Calcium Deficiency. 2020;25(7):1829–40.
49. Chen X, Cubillos-Ruiz JR. Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2021;21(2):71–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41568-020-00312-2>
50. Dorsett Y, Tuschl T. siRNAs: Applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(4):318–29.

51. Dana H, Chalbatani GM, Mahmoodzadeh H, Karimloo R, Rezaiean O, Moradzadeh A, et al. Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *Int J Biomed Sci [Internet]*. 2017;13(2):48–57.
52. Hu B, Zhong L, Weng Y, Peng L, Huang Y, Zhao Y, et al. Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1).
53. Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohmmmed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003;67(4):657–85.
54. Bumcrot D, Manoharan M, Koteliensky V, Sah DWY. RNAi therapeutics: A potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat Chem Biol*. 2006;2(12):711–9.
55. Langdon SP. Cancer Cell Culture. *Cancer Cell Cult*. 2003;731:237–45.
56. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018(6):469–71.
57. Sarıman M. Multiple Myeloma Hastalarının Kemik İliği Myeloma Hücrelerinde Gen İfadesinin Transkriptom Yöntemi İle İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi, (2013) İstanbul
58. Sarıman M. Multiple Myeloma Tüm Genom Transkriptom Datasının Biyoenformatik Analizi ile Belirlenen Olası İlişkili Genlerin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2020.
59. Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Mol Cancer*. 2015;14(1):1–14.
60. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495–516.
61. Blum A, Khalifa S, Nordström K, Simon M, Schulz MH, Schmitt MJ. Transcriptomics of a KDELR1 knockout cell line reveals modulated cell adhesion properties. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–8.
62. Samy A, Kaneyoshi K, Omasa T. Improvement of Intracellular Traffic System by Overexpression of KDEL Receptor 1 in Antibody-Producing CHO Cells. *Biotechnol J*. 2020;15(6).
63. Yamamoto K, Hamada H, Shinkai H, Kohno Y, Koseki H, Aoe T. The KDEL Receptor Modulates the Endoplasmic Reticulum Stress Response through Mitogen-activated Protein Kinase Signaling Cascades. *J Biol Chem*. 2003;278(36):34525–32.

64. Henderson MJ, Richie CT, Airavaara M, Wang Y, Harvey BK. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) secretion and cell surface binding are modulated by KDEL receptors. *J Biol Chem*. 2013;288(6):4209–25.
65. Bauer A, Santen L, Schmitt MJ, Shaebani MR, Becker B. Cell-type-specific differences in KDEL receptor clustering in mammalian cells. *PLoS One*. 2020;15(7 July):1–16.
66. Tapia D, Jiménez T, Zamora C, Espinoza J, Rizzo R, González-Cárdenas A, et al. KDEL receptor regulates secretion by lysosome relocation- and autophagy-dependent modulation of lipid-droplet turnover. *Nat Commun* [Internet]. 2019;10(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-08501-w>
67. Jia J, Yue X, Zhu L, Jing S, Wang Y, Gim B, et al. KDEL receptor is a cell surface receptor that cycles between the plasma membrane and the Golgi via clathrin-mediated transport carriers. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2021;78(3):1085–100. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03570-3>
68. Kamimura D, Katsunuma K, Arima Y, Atsumi T, Jiang JJ, Bando H, et al. KDEL receptor 1 regulates T-cell homeostasis via PP1 that is a key phosphatase for ISR. *Nat Commun* [Internet]. 2015;6(May):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms8474>
69. Marie KL, Sassano A, Yang HH, Michalowski AM, Michael HT, Guo T, et al. Melanoblast transcriptome analysis reveals pathways promoting melanoma metastasis. *Nat Commun* [Internet]. 2020;11(1).
70. Tae MK, Ha JJ, Min YS, Sang CK, Cho G, Chan HP, et al. Determination of genes related to gastrointestinal tract origin cancer cells using a cDNA microarray. *Clin Cancer Res*. 2005;11(1):79–86.
71. Kim HS, Kang SH, Park CH, Yang WI, Jeung HC, Chung HC, et al. Genome-wide molecular characterization of mucinous colorectal adenocarcinoma using cDNA microarray analysis. *Oncol Rep*. 2011;25(3):717–27.
72. Nikesitch N, Ling SCW. Molecular mechanisms in multiple myeloma drug resistance. *J Clin Pathol*. 2016;69(2):97–101.
73. Nikesitch N, Lee JM, Ling S, Roberts TL. Endoplasmic reticulum stress in the development of multiple myeloma and drug resistance. *Clin Transl Immunol*. 2018;7(1):1–13.

HAM VERİLER



FORMLAR

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KDEL R1 VE COPE GENLERİNİN MULTİPL MİYELOM PATOGENEZİNDEKİ ROLÜ

ORJİNALLIK RAPORU

% 5	% 4	% 2	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 2
2	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
3	www.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	<% 1
4	acikerisim.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	KOCABAY, Gönenç, TİRYAKİ, Betül, AKSÖZ, Selçuk and ÇAĞATAY, Atahan. "Önemi bilinmeyen monoklonal gammopati ile ilişkili miliyer tüberküloz ve spinal tüberküloz (Pott hastalığı)", Türk Tüberküloz ve Toraks Derneği, 2008. Yayın	<% 1
6	Taha Ulutan Kars, Atakan Tekinalp, Hatice Zeynep Dikici, Sinan Demircioğlu, Özcan Çeneli. "Multipl Myelom Tanılı Hastaların	<% 1