

FATİMA CEREN TUNÇEL

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2022



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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**KEMİK İLİĞİ NAKLİ OLAN MULTİPLE MYELOMA
HASTALARINDA EPİGENETİK/GENETİK FARKLILIKLARIN
ARAŞTIRILMASI VE KLİNİK PARAMETRELERLE
KARŞILAŞTIRILMASI**

FATIMA CEREN TUNÇEL

**DANIŞMAN
PROF. DR. SACİDE PEHLİVAN**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2022

TEZ ONAYI





İTHAF

Bu yoldaki en büyük destekçim olan sevgili Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda bana yol gösteren, maddi manevi her türlü desteği sağlayan, akademik açıdan bana bir sürü tecrübe katan tez danışmanım, çok sevgili hocam Prof. Dr. Sacide Pehlivan'a,

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fatma Savran Oğuz'a, eğitimimdeki katkılarından dolayı tüm Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Klinik veriler, örnek toplama ve maddi olanaklarıyla destek olan Prof. Dr. Mustafa Pehlivan'a ve Uzm. Dr. İstemi Serine'e

Yüksek Lisans hayatıma başladığım günden beri her anımda bana yardımcı olan, desteğini bir an olsun esirgemeyen çalışma arkadaşım Yasemin Oyacı'ya

Eğitim hayatım boyunca maddi ve en çok manevi desteğini her zaman yanımda hissettiğim sevgili babam Ahmet Safa Tunçel'e, bir gün olsun pes etmeme izin vermeyen sevgili annem Hilal Melal Tunçel'e, abim Selim Yiğit Tunçel'e, birlikte aynı evi paylaştığım her türlü sıkıntım ve heyecanıma ortak olan kız kardeşim Ayşe Dila Tunçel'e ve bu aşamada bütün sıkıntıları unutturan, neşe kaynağım biricik köpeğim Cedi'ye

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET.....	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Kanser	2
2.1.1. Kanserin Oluşum Mekanizması.....	2
2.1.2. Hematolojik Maligniteler	3
2.1.3. Hematolojik Malignitelerin Sınıflandırılması	5
2.1.3.1. Lenfoid Kanserler.....	6
2.1.3.2. Myeloid Kanserler.....	6
2.2. Multiple Myeloma (MM).....	8
2.2.1. Epidemiyoloji	9
2.2.2. Multiple Myeloma Patogenezi.....	9
2.2.2.1. Kromozomal Anormallikler.....	10
2.2.2.2. Somatik Mutasyonlar.....	12
2.2.2.3. Kemik İliği Mikroçevresi	13
2.2.3. Tanı ve Tedavi	14
2.3. DNA Metilasyonu.....	16
2.3.1. DNA Metilasyonu ve Kanser İlişkisi	17
2.4. Multiple Myeloma ve Epigenetik	20
2.5. JAK/STAT Sinyal Yolağı	20
2.6. SOCS (Sitokin Sinyalizasyon Baskılayıcı) Gen Ailesi.....	23
2.6.1. SOCS Kutusu.....	24

2.6.2. SOCS-1 gen ve proteini.....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Hasta ve Kontrol Grubu	29
3.2. Gereçler	29
3.2.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	29
3.2.2. Kullanılan sarf malzemeler ve kimyasallar	30
3.3. Yöntemler	31
3.3.1. Tam Kandan Lökosit İzolasyonu	32
3.3.2. DNA İzolasyonu	33
3.3.3. DNA Saflık ve Konsantrasyon Ölçümleri.....	35
3.3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	36
3.3.4.1. PCR tekniğinde kullanılan cihazlar ve malzemeler	37
3.3.4.2. Primer hazırlığı	38
3.3.4.3. PCR içeriğinin hazırlanması ve PCR koşulları	38
3.3.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)	39
3.3.5.1. Enzim Kesimi.....	40
3.3.6. Kantitatif Metilasyon Spesifik PCR (qMSP).....	41
3.3.6.1. DNA Bisülfid Dönüşümü	41
3.3.6.2. qMSP metodu Primer hazırlığı	44
3.3.6.3. qMSP metodu için gerekli qPCR içeriği ve qPCR koşulları	45
3.3.6.4. qMSP metodunda sonuç hesaplanması	45
3.3.7. Agaroz Jel Elektroforezi.....	47
3.3.7.1. TBE Tampon çözelti Hazırlanması	48
3.3.7.2. Agaroz Jel Hazırlanması.....	48
3.3.7.3. Örneklerin jele yüklenmesi ve yürütülmesi	48
3.3.7.4. Enzim kesim sonuçlarının belirlenmesi.....	49
3.4. İstatistiksel Analiz	49
4. BULGULAR.....	51
4.1. Klinik Veriler	51
4.2. SOCS-1 Geni -1478CA>Del Varyantına ve PMR (yüzde metilasyon değeri)'ye Ait Veriler	52
4.3. MM'li hastaların prognostik faktörleri ile progresyonsuz sağkalım (PFS) ve OS Genel sağ kalım (OS)'nin karşılaştırılması	53

4.4. ROC analizi ile PMR değişkenleri açısından hasta ve kontrol grubunun karşılaştırılması	55
5. TARTIŞMA	58
KAYNAKLAR	62
FORMLAR	78
ETİK KURUL KARARI	81
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	82
ÖZGEÇMİŞ	83



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Myeloid Kök Hücreler.....	4
Tablo 2-2: Lenfoid Kök Hücreler.....	4
Tablo 2-3: Hematolojik Kanserler.....	5
Tablo 2-4: Uluslararası Miyelom Çalışma Grubu, multiple myelom ve ilgili plazma hücre bozuklukları için tanı kriterleri.....	15-16
Tablo 2-5: SOCS ailesi üyelerinin en iyi tanımlanmış indükleyicileri, düzenleyicileri (birincil) ve SH2 hedefleri.....	26
Tablo 3-1: Çalışılan gen bölgesini primer dizileri ve koşulları.....	38
Tablo 3-2: SOCS1-1478CA/del bölgesi için hazırlanan PCR içeriği.....	38-39
Tablo 3-3: SOCS1-1478CA/del bölgesi için PCR koşulları.....	39
Tablo 3-4: SOCS1-1478CA/del bölgesi için DdeI enzim kesimi içeriği.....	40
Tablo 3-5: Çalışılan bölgenin analizinde kullanılan kesim enzimi.....	41
Tablo 3-6: DNA Bisülfid dönüşümü PCR koşulları.....	43
Tablo 3-7: Çalışmada kullanılan primer dizileri ve bağlanma sıcaklıkları.....	44
Tablo 3-8: qMSP metodu PCR içeriği.....	47
Tablo 3-9: qMSP metodu PCR koşulları.....	47
Tablo 3-10: Çalışılan bölgeye ait allel bantlarının uzunlukları.....	49
Tablo 4-1: Otolog kemik iliği transplantasyonu (APSCT) olan MM hastaları ve sağlıklı kontrol grubuna ait klinik veriler, tedavi rejimleri.....	51-52
Tablo 4-2: SOCS-1 Geni -1478CA>Del varyantı genotip, allel dağılımı ve PMR.....	53
Tablo 4-3: MM'li hastaların prognostik faktörleri ile PFS ve OS'nin karşılaştırılması...	54
Tablo 4-4: ROC eğrisinin altında kalan alan (AUC).....	55
Tablo 4-5: Youden indeksi.....	56
Tablo 4-6: ROC eğrisinin ölçüt değerleri.....	56
Tablo 4-7: ROC eğrisinin kesim noktasına göre ayrılan hasta gruplarının klinik parametreler bakımından karşılaştırılması.....	56-57

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: DNA metilasyonu kimyasal gösterimi (126).....	17
Şekil 2-2: Kanserdeki DNA Modeli (137).....	19
Şekil 2-3: Janus Kinaz (JAK) Sinyal Dönüştürücünün Yapısı, Aktivasyonu ve Transkripsiyon Aktivatör (JAK-STAT) Sinyalleşmesi (149).....	22
Şekil 2-4: Sitokin sinyalizasyon baskılayıcı (SOCS) ailesinin moleküler yapısı (155)...	25
Şekil 2-5: SOCS proteinin yapısı (155).....	25
Şekil 2-6: SOCS1, SOCS3 ve CIS tarafından JAK/STAT yolunun baskılanma mekanizması (155).....	28
Şekil 3-1: Polimeraz zincir reaksiyonu aşamaları (159).....	37
Şekil 3-2:qMSP sonuç grafiği.....	46
Şekil 3-3: Ct/Cq değerlerini içeren grafik.....	46
Şekil 4-1: 1478CA>Del bölgesi PCR ve kesim ürünleri.....	52
Şekil 4-2: Metilasyon durumu açısından hasta alt grupları arasında progresyonsuz sağkalım (PFS) analizi.....	54
Şekil 4-3: ROC eğrisinin koordinatları.....	56

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

MM:	Multiple myeloma
Kİ:	Kemik iliği
PH:	Plazma hücresi
UV:	Ultraviyole
P53:	Tümör protein 53
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü
FAB:	Fransız-Amerikan-İngiliz işbirliği
AML:	Akut myeloid lösemi
APL:	Akut promyelositik lösemi
MDS:	Miyelodiplastik sendromlar
ALL:	Akut lenfoblastik lösemi
KLL:	Kronik lenfoblastik lösemi
HLL:	Tüylü hücreli lösemi
KML:	Kronik myeloid lösemi
MGUS:	Belirsiz monoklonal gammopati
IgH:	İmmüoglobulin ağır zincir
CCND1:	Siklin D1
CCND3:	Siklin D3
FISH:	Floresan in situ hibridizasyon
PCR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
MMSET:	Multiple myeloma SET proteini
FGFR3:	Fibroblast büyüme faktör reseptör 3

IgG:	İmmunoglobulin G
del:	Delesyon
MYC:	MYC Proto-onkogen
IgL:	İmmunoglobulin L
IgK:	İmmunoglobulin K
FAM46C:	Sıra benzerliği olan aile üyesi 46 C
MAPK:	Mitojen aktive edici protein kinaz
NFKB:	Nükleer faktör kappa B
KRAS:	KRAS proto-onkogen, GTPaz
NRAS:	NRAS proto-onkogen, GTPaz
RAS:	G protein proro-onkogen
BRAF:	B-raf proto-onkogen, serin-treonin kinaz
TRAF:	TNF reseptör ilişkili faktör
CYLD:	CYLD Lizin 63 Deubiquitinaz
BIRC:	Baküloviral IAP tekrarı içeren
IKBKB:	Nükleer faktör kappa B kinaz alt birimi beta inhibitörü
ATM:	ATM serin-treonin kinaz
ATR:	ATR serin-treonin kinaz
CXCR4:	C-X-C motif kemokin reseptör 4
CD147,CD45:	İmmunoglobulin süperaile üyeleri
RANK:	NFKB reseptör aktivatörü
BCL2:	BCL2 apoptoz düzenleyicisi
CCND2:	Siklin D2
CRAB:	MM tan kriterlerinin genel adı

SMM:	İçten yanmalı multiple myeloma
IMWG:	Uluslararası myelom çalışma grubu
BT:	Tüm vücut bilgisayar tomografisi
PET:	Pozitron emisyon tomografisi
SAM:	S- adenzilmetiyonu
CH3:	Metil grubu
CpG:	Sitozin ve guanince zengin promoter bölge
MBD:	Metil bağlama proteini
DNMT:	DNA metiltransferaz
NGS:	Yeni nesil dizileme
CIMP:	CpG adası metilatör fenotip
LINE:	Genomik tekrar dizisi
NOTCH:	NOTCH (çentik) reseptör 1
JAG2:	Pürüzlü kanonik NOTCH (çentik) ligand 2
IL-6:	İnterlökin-6
VEGF:	Vasküler endotelial büyüme faktörü
IGF-1:	İnsülin benzeri büyüme faktörü
P16:	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü
APC:	WNT sinyal Yolu regülatörü
SHP1:	Protein tirozin fosfataz
DAPK:	Ölüm ilişkili protein kinaz
BNIP3:	BCL2 ilişkili protein 3
CDH1:	Kaderin 1
GJA1:	Gap junction protein alfa 1

MGMT:	O-6-metilguanin DNA metiltransferaz
JAK/TYK:	Janus kinaz
STAT:	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
JAK/STAT:	JAK sinyal aktivasyon dönüştürücüsü
SH2:	Src- homoloji 2
PTB:	Fosfotirozin bağlama alanı
PI3K:	fosfatidilinositol 3-kinaz
PIAS:	STAT inhibitörü
SOCS:	Sitokin sinyalleme sinin baskılayıcısı
IFN:	İnterferon
CIS:	SH2 içeren protein
SOCS-1:	Sitokin sinyalleme sinin baskılayıcısı 1
KIR:	Kinaz inhibitör bölgesi
EDTA:	Etilendiamin tetraasetik asit
MgCL ₂ :	Magnezyum klorür
qMSP:	Kantitatif metilasyon spesifik PCR
ACTB:	B- actin (İnternal kontrol)
PMR:	Yüzde metilasyon değeri
Ct/Cq:	Amplifikasyon eğrisinin eşik değeri aştığı döngü sayısı
ROC:	Alıcı işletim karakteristiği
ASCT:	Otolog kök hücre transplantasyonu
ISS:	Uluslararası evreleme sistemi
Revised-ISS:	Revize-ISS
PFS:	Progresyonsuz sağkalım

OS:	Genel sağkalım
LDH:	Laktat dehidrogenaz
OR:	Olasılık oranı
AZA:	Azasitidin
LD:	Lenalidomid, deksametazon
VCD:	Bortezomib, siklofosfamid ve deksametazon



ÖZET

Tunçel, F.C. (2022). Kemik iliği nakli olan multiple myeloma hastalarında epigenetik/genetik farklılıkların araştırılması ve klinik parametrelerle karşılaştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji AD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Sitokin sinyalleme-1'in (SOCS-1) baskılayıcısı, uygun bir bağışıklık tepkisini indükleme işlevi görür ve interferon sinyalleşmesinin temel bir fizyolojik düzenleyicisidir. DNA metilasyonu, sitozinin karbon 5 pozisyonuna bir metil grubunun eklenmesini içerir. Bu çalışmada, MM'li hastalar ile sağlıklı kontroller arasında SOCS-1 gen hipermetilasyonunun karşılaştırılması yanında, SOCS-1 gen varyant dağılımının ve ayrıca SOCS-1 hipermetilasyonunun progresyonsuz sağkalıma (PFS) ve genel sağkalım etkisinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu tez çalışmasına MM tanısı almış 120 hasta ve 80 sağlıklı birey dahil edildi. SOCS-1 genotiplerinin dağılımı, hastalar ve sağlıklı kontroller arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Ayrıca bu genotiplerin sağ kalım üzerindeki istatistiksel olarak anlamlı etkileri incelendi.. SOCS-1'in CA/CA genotipi sağlıklı kontrollerde istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,001$), Del/Del genotipi ise MM'li hastalarda anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0,034$). SOCS-1 geninin yüzde metillenmiş referans (PMR) değeri sağlıklı kontrollerde anlamlı olarak daha yüksek bulundu (medyan: 43,48, aralık: 2,76-247,75; $p=0,001$). PMR değeri $<43,48$ olan hastalarda önemli ölçüde daha uzun PFS vardı ($<43,48$ %56 için, $\geq 43,48$ %43 için; $p=0,027$). SOCS-1 polimorfizmlerinin MM ve SOCS-1 metilasyonunun patogeneze etkileri literatüre ışık tutacaktır.

Anahtar Kelimeler: Multiple myeloma, SOCS-1, DNA metilasyonu, hayatta kalma, PCR-RFLP.

ABSTRACT

Tuncel, F.C. (2022). Investigation of epigenetic/genetic differences in multiple myeloma patients with bone marrow transplant and comparison with clinical parameters. Istanbul University Institute of Health Sciences, Department of Medical Biology. Master Thesis. Istanbul.

The suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1) functions to induce an appropriate immune response and is an essential physiological regulator of interferon signaling. DNA methylation involves the addition of a methyl group to the carbon 5 position of cytosine. In this study, besides comparing SOCS-1 gene hypermethylation between patients with MM and healthy controls, it was aimed to demonstrate the effect of SOCS-1 gene distribution and additionally, the effect of hypermethylation of SOCS-1 on progression free survival (PFS) and overall survival. In this study, 120 patients diagnosed with MM and 80 healthy individuals were included. The distribution of the SOCS-1 genotypes was statistically compared between patients and healthy controls. Additionally, the statistically significant effects of these genotypes on survival were examined. CA/CA genotype of SOCS-1 was found to be statistically significantly higher in healthy controls ($p=0,001$), while Del/Del genotype was significantly higher in patients with MM ($p=0,034$). The percent methylated reference (PMR) value of the SOCS-1 gene was found to be significantly higher in the healthy controls (median: 43,48, range: 2,76-247,75; $p=0,001$). Patients with a PMR value of $<43,48$ had a significantly longer PFS (for $<43,48$ %56, for $\geq 43,48$ %43; $p=0,027$). The effects of SOCS-1 polymorphisms on the pathogenesis of MM and SOCS-1 methylation will shed light on the literature.

Keywords: Multiple myeloma, SOCS-1, DNA methylation, survival, PCR-RFLP.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Multiple myeloma (MM), kemik iliğindeki (Kİ) plazma hücrelerinin (PH) klonal proliferasyonu ile karakterize edilen malign B hücresi neoplazmidir (1,2). Yapılan çalışmalar sonucunda MM'nin tüm hematolojik kanserlerin yaklaşık % 10'unu oluşturduğu tespit edilmiştir (3). Hastalık, erkeklerde kadınlara oranla daha sık görülmekte olup, ortalama tanı yaşı ise yaklaşık 65'tir (3,4).

MM patogenezi, kemik iliği mikro-çevrenin oluşumunda, karyotipik instabilitede, sinyal yolu anormalliklerinde ve osteoklast aktive edici faktörler gibi sitokinlerin üretiminde çok sayıda değişiklik ile ilişkilidir (5). Bu genetik temelli olayların birikmesinin plazma hücrelerinin malign transformasyonu için çok önemli olduğu düşünülmektedir. Genetik temelli değişikliklere ek olarak epigenetik süreçlerin MM patogenezinde büyük bir rol oynadığına dair kanıtlar artmaktadır (2).

Epigenetik düzenlemenin önemli bir modülü olan DNA metilasyonu MM ilerlemesi ile yakından ilişkilidir. Bu durum MM evresi ile metilasyon modeli arasında bir ilişki kurulmasına yardımcı olmuştur. Yapılan çalışmalar ile spesifik genlerin promotor bölgelerinin metilasyonunun, MM dahil çok sayıda tümör ve terapötik yanıtta önemli roller oynadığı bildirilmiştir(5).

Multiple myeloma patogenezinde rolü olabilecek genlerin hem genetik hem de epigenetik mekanizmalarını bilmek, bu genlerin hastalığın oluşumu ve ilerlemesi arasındaki ilişkiyi anlamamıza, teşhis ve tedavide bir biyobelirteç olup olmayacağını açıklamamıza yardım edecektir. Bu bilgilerin ışığında çalışmamızdaki amaç; multiple myelomanın ortaya çıkması veya ilerlemesi üzerine etkisi olabilecek genlerin gen varyantları ve metilasyon düzeylerini belirlemek ve elde ettiğimiz verileri klinik parametrelerle karşılaştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Ultraviyole (UV) ışınları, kimyasal mutajenler gibi ekzojen kaynaklı etkenlerden ötürü hücre bölünmesi ve kontrol noktalarında zarar gören hücrelerin kontrolsüz bir şekilde aşırı bölünmesi ve daha sonra da yayılım göstermesi ile karakterize edilen bir hastalıktır (6,7). Kanser, bütün dünyada sağlık problemleri içinde önemli bir yere sahiptir. Yapılan istatistiksel çalışmalar ışığında ekonomik olarak gelişmiş ülkelerde birinci, gelişmekte olan ülkelere ise kalp hastalıklarından sonra ikinci ölüm sebebi olarak değerlendirilir (8-10). Yine aynı istatistiklere göre kadınlarda en çok ölüme yol açan kanser türlerinde meme kanseri gösterilmektedirken, erkeklerde ise akciğer kanseri ölüme en çok yol açan kanser türü olarak görülmektedir (11). Hastalığın ölümlerle sonuçlanmasındaki en önemli etken kanserin kendisinin değil, metastaz halinde başka dokulara ve organlara yayılımıdır (7).

Tıp alanındaki gelişmelerle beraber bazı kanser türleri tedavi edilebilmekte, bazıları ise hastanın yaşam süresi uzatılarak kronik bir sürece dönüştürülebilmektedir. Kanser tedavisinde çoğunlukla kemoterapi, radyoterapi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Tedavide kullanılan kemoterapinin ana amacı kanserli hücrelere zarar vererek tümör hücrelerinin çoğalmasını engellemek ve onları ortadan kaldırmaktır (10). Kemoterapik ilaçlar kanserli hücrelerin gelişip, çoğalmasını engellemek amacıyla kullanılır. Ancak bu ilaçların çoğu normal hücrelere de zarar verdiği için normal hücrelerin de zarar görmesine neden olmaktadır. Kemoterapi ilaçları etki özelliklerine bağlı olarak bireylerde rahatsız edici pek çok yan etkiye yol açabilmektedir (10). Bu yan etkiler kullanılan ilaçların özelliklerine bağlı olarak değişmesinin yanı sıra bulantı, kusma, iştahsızlık, saç dökülmesi, cilt problemleri, uykusuzluk, nörolojik problemler gibi çeşitli şekillerde görülebilir (12-14). Radyoterapi ise kanser hastalarının tedavisinde kullanılan bir başka yöntemdir. Bu yöntemde amaç kanserli hücreleri tahrip etmektir ve bunun için iyonize radyasyon kullanılmaktadır (15).

2.1.1. Kanserin Oluşum Mekanizması

Kanserin oluşum mekanizmasını anlayabilmek için öncelikle hücrelerin yaşamlarını devam ettirmek ve sonlandırmak için ne tür mekanizmalar kullandıklarını bilmeliyiz. Hücreler büyüme, bölünme ve apoptozis gibi yönetim ve denetim mekanizmaları ile yaşamını devam ettirmekte ve sonlandırmaktadır. Hücresel denetimden sorumlu olan bu

mekanizmaların devre dışı kalması ile karsinogenez görülmektedir. Karsinogenez; kontrolsüz hücre çoğalması, çoğalan bu hücrelerin yakın dokulara invazyon ve uzak organlara metastaz yeteneği kazanması sürecinin tamamına verilen addır (16,17).

Malign dönüşüme neden olan bu mutasyonlar; büyüme ve hücre çoğalmasını tetikleyen proto-onko genlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genler, DNA onarım enzimleri ve apoptozisin inaktivasyonu olarak sınıflandırılmaktadır (18-20).

Onkogen aktivasyonu; Proto-onkogenlerin, hücreye kontrolsüz proliferasyon komutları verecek şekilde mutasyon geçirmeleri anlamına gelmektedir. Bu mutasyonlar; nokta mutasyonları, kromozom translokasyonu ve gen amplifikasyonu gibi genetik yapıyı değiştiren olaylardır. Onkogenleri aktive olan hücre artık yeni bir fonksiyon kazanmıştır (gain-of-function) (18,20). Aktive olan onkogenler hücre çoğalmasını tetikleyen proteinleri kodlamaya başlarlar. Söz konusu proteinler; büyüme faktörlerinin hücre membranı üzerindeki reseptörlere bağlanmasından, genetik materyalin transkripsiyonuna kadar birçok aşamayı etkilemektedir (18,21,22).

Meydana gelen mutasyonlar bazı genler ve bu genlerin kodladığı proteinler tarafından belirlenerek etkisiz hale getirilebilmektedir (18). Genetik materyalin denetiminden sorumlu bu genlerin görevi aşırı ve kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olabilecek mutasyonları ortadan kaldırmak ve genomun bütünlüğünü korumaktır (18,23). Tümör baskılayıcı genler olarak adlandırılan bu genlerin en fazla tanımlanmış olanı p53 genidir (18). Koşullar normal olduğunda az eksprese olan p53, genetik materyal üzerinde bir hasar oluştuğunda hücre bölünmesini durdurarak hasarın niteliğini değerlendirmektedir. Onarılamayacak boyutta bir hasar meydana geldiğinde ise, hücre bölünmesi iptal edilir ve apoptozis aktive edilerek hücrenin yaşamına son verilir (18,24).

Fakat tümör hücreleri apoptozisten kaçacak mekanizmalar geliştirirler. Apoptotik ölüme direnç kazanan hücreler DNA'larında bulunan mutasyonlar ile yaşamaya ve çoğalmaya devam etmektedir (25,26).

2.1.2. Hematolojik Maligniteler

Hematopoetik, kan oluşturan anlamına gelen latince bir kelimedir. Vücudumuzdaki kan hücrelerinin tümü hematopoetik kök hücrelerden meydana gelir. Kök hücre terimi hormon ve büyüme faktörlerine mağruz kalan bu sayede farklı hücrelere dönüşebilen hücreler için kullanılır. Bunlara kısaca multipotent hücreler denmektedir. Multipotent bir

kök hücre lenfoid ya da myeloid kök hücrelere dönüşür. Lenfoid kök hücreler lenfositlere dönüşürler. Çoğu dalak, lenf bezi ve lenf kanallarında bulunur ve kana geçmezler. Hematopoetik kök hücreler kemik iliğinde üretilirler. Kemik iliği kemiğin merkezinde bulunan süngerimsi dokuya verilen addır. Yenidoğanlarda tüm kemiklerde aktif şekilde bulunuyorken, erişkinliğe doğru aktif kemik sayısı giderek azalır. Erişkinlerde kemik iliği üretimi omurga, kalça, kafatası, göğüs kafesi ve omuz kemiklerinde yapılır. Myeloid ve lenfoid kök hücreler ve alt tiplerinden her hangi birinde meydana gelen kontrolsüz çoğalma hematolojik maligniteler olan kötü huylu kan hastalıklarını meydana getirir (27). Myeloid ve lenfoid kök hücreler Tablo 2.1 ve 2.2’ de gösterilmiştir.

Tablo 2-1: Myeloid Kök Hücreler

Eritrosit (Kırmızı kan hücreleri, alyuvar)	Trombositler (Kan pulçukları)	Lökositler (Beyaz kan hücreleri, akyuvar)
Aktif oksijen ve karbondioksit taşıyan hemoglobin proteinini barındıran hücrelerdir.	Pıhtılaşmada rol alan hücrelerdir.	Vücudun bağışıklık sistemini oluşturur. Dışarıdan giren virüs, bakteri gibi zararlılara karşı vücudu savunurlar. Granülositler (nötrofil, bazofil, eozinofil) Monositler Lenfositler

Tablo 2-2: Lenfoid Kök Hücreler

B-Lenfositler	T-Lenfositler	NK (Doğal katil hücreler)
Bağışıklıktan sorumlu antikoları üretirler.	B-lenfositlere yardımcı hücrelerdir.	Kanser hücrelerine ve virüslere saldırırlar.

2.1.3. Hematolojik Malignitelerin Sınıflandırılması

Hematolojik maligniteler solid (katı) olmayan tümörlerdir. Çoğu zaman “sıvı tümörler” olarakta adlandırılırlar (29,30). Son yıllarda yapılan çalışmalar hematolojik malignitelerin dünya çapında bildirilen tüm kanser tanılarının yaklaşık % 6,6'sından fazlasını oluşturduğunu göstermiştir (28). Hematolojik kanserler lenfoid ve myeloid kanserler olmak üzere iki gruba ayrılır. Tablo 2.3’ de hematolojik kanserler ve çeşitlerinin bir kısmı verilmiştir.

Tablo 2-3: Hematolojik Kanserler

Lenfoid Kanserler	Myeloid Kanserler
ALL (Akut Lenfoblastik Lösemi)	AML (Akut Myeloid Lösemi)
KLL (Kronik Lenfoblastik Lösemi)	APL (Akut Promyelositik Lösemi)
HHL (Saçlı (tüylü) Hücreli Lösemi)	KML (Kronik Myeloid Lösemi)
	MDS (Miyelodisplastik Sendromlar)
	MM (Multiple Myeloma)

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) hematolojik kanserlerin sınıflandırılması için bir kılavuz hazırlamıştır (31). WHO tarafından hazırlanan sınıflandırma şeması, esas olarak morfolojik, sitokimyasal ve histolojik verilere dayanır. Bu veriler periyodik olarak genetik kriterlerle karşılaştırılarak revize edilir. Fransız-Amerikan-İngiliz işbirliği grubu olan FAB ise ayrı bir sınıflandırma şemasına sahiptir. FAB’a göre akut lösemileri sınıflandırmak için morfoloji ve sitokimyasal boyalardan elde edilen verileri kullanır (32, 35). FAB şeması, AML’nin lösemik hücrelerini sekiz alt tipe M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6 ve M7 olarak böler. Akut promyelositik lösemi (APL), alt tip M3 olarak belirlenmiştir (36). APL aslında, AML’li yetişkinlerin yaklaşık % 10’unu oluşturan bir AML alt kümesidir (37). FAB sınıflandırma şeması ayrıca MDS’den AML ilerlemeyi görebilmek için de kullanılır (38). Çeşitli lösemilerdeki kanserli hücreler ve çeşitli MDS’deki kanser hücreleri, sitogenetik ve akış sitometrisi ile birbirinden ayırt edilebilir (39).

2.1.3.1. Lenfoid Kanserler

A. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL):

Normal hücrelerde olgunlaşmış olarak bulunan lenfositler, ALL'de olgunlaşmamış lenfoblastlar olarak bulunurlar. Lösemi, 15 yaş altı çocuklarda en sık görülen kanser türüdür. Bu çocuklar için ALL, AML'den yaklaşık beş kat daha yaygındır ve tüm çocukluk çağı lösemi tanılarının yaklaşık % 76'sını oluşturur (40). Normal lenfosit hücrelerinden farklı olarak, lenfoblastlar asparagini biyosentezleyen enzim olan asparaginazdan yoksundur. Asparaginaz, hücre dışı asparajinin aspartik asit ve amonyaka parçalanmasını katalize eder. (41). Bu da lenfoblastlarda asparjin birikimi ve lenfositik lösemik hücrelerin büyümesine neden olmaktadır. Appelbaum ve ark. (42) yapmış oldukları çalışma ile ALL'nin, enzim olan asparaginaz'ın eksojen kaynak olarak uygulanmasıyla hastalığın tedavi edilebilir olduğunu söylemişlerdir (43,44).

B. Kronik Lenfoblastik Lösemi (KLL):

Hastalık periferik kanda hızla yükselen lenfosit artışı ile karakterizedir. Bu artış genellikle 6 aydan kısa bir sürede meydana gelmektedir (45). Hastalığın tanısında; enfeksiyon bulgusu olmayan ateş, aşırı yorgunluk, gece terlemeleri, kilo kaybı ve sık enfeksiyon geçirme bulunmaktadır. Hastalık ayrıca kemik iliği yetmezliği nedeniyle anemi veya trombositopeni ile sonuçlanır (46,47).

C. Saçlı (tüylü) Hücreli Lösemi (HLL):

Myeloid enfoid lösemilerin yaklaşık % 2'sini oluşturan nadir bir lenfositik kanser türüdür (48). Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda sadece 500 ile 800 yeni vaka tespit edilmektedir (49). Aşırı çoğalmış T hücrelerini öldüren bir ilaç olan Kladribin, HHL hastalarının en az % 80'inin tedavisinde etkili sonuçlar vermiştir (50,51). Bir ilaç haftalık tedavisi tipik olarak on yıl süren remisyonlarla sonuçlanır (52). Kladribin, bulantı ve saç dökülmesi gibi kemoterapinin tipik yan etkilerinden yoksundur, ancak virüslerden veya daha önce *Pneumocystis carinii* olarak bilinen bir mantar olan *Pneumocystis jirovecii* enfeksiyonlarını kolaylaştırabilir (53).

2.1.3.2. Myeloid Kanserler

A. Akut Myeloid Lösemi (AML):

Yetişkinlerdeki tüm lösemilerin yaklaşık % 25'ini oluşturur (54). Bu hastalıkta lökositlerin alt gruplarından nötrofil, monosit gibi olgun hücreler oluşamaz ve vücut infeksiyonlara karşı savunmasız kalır. Oluşan hücreler olgun olmayan blast formlardır ve görev yapamazlar. Ayrıca olgunlaşmamış bu hücreler kemik iliğinde birikerek eritrosit ve trombosit gibi diğer normal kan hücrelerinin de üretimini bozlarlar (55). Hastalık yorgunluk, morarma veya kanama, ateş ve enfeksiyon ile kendini gösterir (56). Yapılan çeşitli çalışmalarla AML'nin her yaşta bireyde geliştiği, ancak insidansının ilerleyen yaşla birlikte arttığı ve 65 yaşından büyük hastalarda dramatik olarak yükseldiği gösterilmiştir (57). AML tedavisine rağmen, genç yetişkinlerin üçte ikisi ve yaşlı yetişkinlerin % 90'ı hala hastalıktan dolayı ölmektedir (58).

B. Akut Promyelositik Lösemi (APL):

APL, AML'nin bir alt kümesidir ve AML'li yetişkinlerin yaklaşık % 10'unu oluşturur (59). APL, aniden gelişen kanama ile kendini gösterir (60). Kanama potansiyel olarak ölümcüldür ve ölüm, merkezi sinir sistemi, akciğerler veya gastrointestinal sistemdeki kanamalardan kaynaklanabilir (61). APL, kromozom 15 ve 17 arasında translokasyonun olduğu bir kromozomal kusuru içerir. Bu translokasyon, PML geni ve retinoik asit reseptör-alfa genini (RAR-alfa) içeren füzyon genini oluşturur. PML "promyelosit" anlamına gelir. Ortaya çıkan füzyon geni ve ifade edilen füzyon proteini, PML RAR-alfa olarak adlandırılır. Füzyon proteini, hücrelerin farklılaşmasını bloke eder (62). Hastalık tedaviye AML'den çok daha iyi yanıt vermektedir.

C. Kronik Myeloid Lösemi (KML):

Tüm lösemilerin yaklaşık % 14'ünü oluşturan potansiyel olarak ölümcül bir kök hücre kanseridir (63). Hastaların % 80'den fazlası, KML evresinden bağımsız olarak yorgunluktan şikayet eder. Bu hastalarında yaklaşık %40'ı normal tetkikler için gittikleri kontrolde kan sayımlarında anormal derecede artmış kan hücrelerine rastlarlar (64). Özellikle granulosit tipindeki hücrelerin artışıyla karakterizedir. Aşırı çoğalan granülositlerin yapılarında meydana gelen bozuklulardan dolayı fonksiyonlarını yerine getiremez hale geldiklerinde lösemik hücrelere dönüşürler. Lösemide hücrelerle birlikte trombositlerde de artışın meydana gelmesi hastalıklığın oluşumuyla ilgili şikayetleri beraberinde getirir (55). Yapılan

çalışmalar göstermiştir ki İmatinib, yeni teşhis edilen KML vakalarını tedavi etmek için etkilidir. İmatinib'in işe yaramadığı durumlarda, aynı zamanda imatinib gibi tirozin kinaz inhibitörleri olan nilotinib veya dasatinib kullanılabilir (65-67).

D. Miyelodisplastik Sendromlar (MDS):

Miyelodisplastik sendromlar (MDS), anemi, nötropeni ve trombositopeni içeren bir grup bozukluktur. Anemi kronik yorgunluk ve nefes darlığı ile sonuçlanır, nötropeni enfeksiyon artışı ile sonuçlanır ve trombositopeni (düşük trombosit) artan kanama ve morarma ile sonuçlanır. Bu nedenle, bir hasta anemi, enfeksiyon ve kanama ile başvurduğunda, doktor ilk olarak MDS'den şüphelenebilir. MDS, başka bir kanser türü olan AML'ye yol açabilmeleri ile ayırt edilir (68). MDS herhangi bir yaşta ortaya çıkabilmesine rağmen, hastaların % 70'inden fazlası 70 yaş veya üzerindedir (69).

2.2. Multiple Myeloma (MM)

Multiple myeloma (MM), neoplastik plazma hücrelerinin çoğalması ve monoklonal immünoglobülin üretimi ile karakterize edilen malign bir neoplazmdır. Dünya çapında neoplazmların % 1-2'sini ve tüm kanser ölümlerinin % 2'sini oluşturan ikinci en yaygın hematolojik malignitedir (70). MM, hastaların çoğunda monoklonal immünoglobulin ağır zincirleri (M-protein) veya hafif zincirlerin üretimi ile karakterizedir (71). Profesör Jan Waldenström ilk olarak 1960 yılında asemptomatik hastaların kanında bir M-proteini bulgusuna rastlamış ve bu durumu “esansiyel hipergamaglobulinemi” olarak adlandırmıştır (72). Kyle ise daha sonra monoklonal gamopatileri olan hastaların, plazma hücreli malignitelerden multiple myelom geliştirme riskinin daha yüksek olduğunu gözlemlemiş ve bu nedenle bu gammopatinin her zaman iyi huylu olmadığı sonucuna varmıştır. Böylece önemi belirsiz monoklonal gammopati (MGUS) terimi ortaya çıkmıştır (73).

Genetik olarak bakıldığında MM, çoklu genetik değişiklikleri ve beraberinde dallanmış hastalık evrimini içeren karmaşık bir durumdur. MGUS'tan multiple myelomaya ilerleme sırasında, plazma hücreleri bir dizi genetik değişim ve bağışıklık sistemine ait özelleşmiş hücrelerden kaçma yeteneği kazanır. Genetik sapmaları ve fonksiyonel değişiklikleri tespit etme teknikleri giderek daha hassas ve kesin hale gelmektedir. Myelomda

sitogenetik değişikliklerin yanı sıra çeşitli hücrel mekanizmaları etkileyen somatik mutasyonlar da tanımlanmıştır (74).

Ayrıca myelomda, hastalığın ilerlemesini teşvik etmek için çeşitli şekillerde hareket eden kemik iliği mikroçevresi ve bağışıklık sistemi ile yoğun bir etkileşim vardır.

2.2.1. Epidemiyoloji

En son Küresel Kanser Gözlemevi (GLOBOCAN) istatistiklerine göre, 2018'de tüm kanser tanılarının % 0,9'unu oluşturan tahminen 160.000 MM vakasının varolduğu bildirilmiştir (75). Bu vakaların yaklaşık 90.000'i erkek ve 70.000'i kadındır; bu da, sırasıyla 2.1/100.000 ve 1.4/100.000'lik yaşıa göre standardize edilmiş bir insidansa eşit olmaktadır. Doğumdan 74 yaşına kadar kümülatif tanı alma riski erkeklerde % 0,24 ve kadınlarda % 0,17'dir, bu da hastalığı erkeklerde yaklaşık 1,5 kat daha olası hale getirmektedir (76). Avustralya, Batı Avrupa ve ABD'de en yüksek insidans ile dünyada görülme sıklığı artmaktadır. ABD'de, 2020 yılında tüm kanser teşhislerinin %1,8'ini oluşturan 32.000 vakanın teşhis edildiği tahmin edilmektedir. Bu, multiple miyelomayı en yaygın 14. neoplazm yapmaktadır. Mevcut tahmini insidans oranı, 7.0/100.000, insidansın 4.9/100.000 olduğu 1975'ten bu yana % 143'lük bir artış olduğu bildirilmiştir (77).

2.2.2. Multiple Myeloma Patogenezi

Multiple myelomalı hastalarda plazma hücrelerinin % 90'ında sitogenetik anormallikler saptanır ve çok aşamalı genetik değişiklikler bazı kişilerde MGUS'tan multiple myelomaya ilerler (78,79). MGUS'lu hastalarda yılda yaklaşık %1 oranında multiple myeloma gelişir (79). Normal plazma hücrelerinin MGUS oluşumunu destekleyen dönüşümlerinin moleküler temeli belirsizdir, ancak siklin D proteinleri aile üyelerinde (siklinler D1, D2 ve D3) meydana gelen düzensizlikler MM'nin çok erken evrelerinde bulunan bir anormallik olarak bilinmektedir (80). Bu düzensizlikler IgH geni ile CCND1 (siklin D1) ve CCND3 (siklin D3) translokasyonlarını, spesifik siklin D gen amplifikasyonlarını, trizomileri ve farklı bir çok sitogenetik olayları içeren mekanizmalardır (81). Siklin D ekspresyonunun yukarı regülasyonu, anormal plazma hücresinin oluşumunda erken dönemde meydana gelen bir olay gibi görünse de, hastalığı MGUS'tan MM'ye yönlendirmek için tek başına yeterli değildir (82).

2.2.2.1. Kromozomal Anormallikler

Myelom, kromozomal anormalliklere göre genel olarak iki gruba ayrılabilir; 3,5,7,9,11,15,19 ve 21 numaralı kromozomlarda meydana gelen trizomiler (hiperdiploidi) ve kromozom 14 üzerinde lokalize olan IgH içeren translokasyonlardır. Bu olaylar, miyelomun evriminin en az iki farklı yolu izleyebileceğini gösteren başlatıcı veya birincil olaylar olarak kabul edilir (83,84). Myelomlu hastaların % 45'inde IgH translokasyonları ve % 50'sinde hiperdiploidi bulunur (74). Myelom hastalarının yaklaşık % 10'unda hem IgH translokasyonu hem de hiperdiploidi bulunurken, % 5'inde ne IgH translokasyonu ne de hiperdiploidi saptanamaz. Bu durum birincil sitogenetik olaylara ek olarak, miyelomda bir dizi kromozomal anormalliklerin yanı sıra somatik mutasyonlar bulunduğunu göstermektedir (83).

a. IgH Translokasyonu

Translokasyon, çift sarmallı DNA kırılması ve anormal bir şekilde yeniden birleşmesinden meydana gelir (85). Lenf düğümlerinin germinal merkezindeki B-lenfositlerinin olgunlaşma sürecinde, antikorun afinitesini arttırmak için immünoglobulin ağır zincir (IgH) geninde genetik düzenleme olur. İlk olarak, somatik hipermutasyon adı verilen bir süreçte hiperdeğişken bölgenin (V-D-J) yeniden düzenlenmesi gerçekleşir. Daha sonra hücre, farklı izotiplerde antikorlarla sonuçlanan sınıf geçişli rekombinasyona uğrar (86). Hem somatik hipermutasyon hem de sınıf geçişli rekombinasyon, immünoglobulin lokusunda (14q32) çift sarmallı DNA kırılmalarına neden olur ve aktivasyonla indüklenen deaminazın (AID) ekspresyonunu gerektirir. Sıkı kontrol mekanizmalarına rağmen, bu genetik düzenleme, anormal yeniden birleşmeye ve dolayısıyla kromozomal değişikliklere neden olmaktadır (71,74,87).

IgH translokasyonlarının çoğu, sınıf değiştirme rekombinasyonu veya somatik hipermutasyon sırasında meydana gelir, ancak translokasyonlar, pro-B-lenfositlerin erken aşamaları dahil olmak üzere B-hücresi gelişimi sırasında çeşitli aşamalarda da meydana gelebilir. Myelomdaki en yaygın IgH translokasyonları t(4;14), t(6;14), t(11;14), t(14;16) ve t(14;20) olup, hepsi bir onkogen ile sonuçlanır. Bu translokasyonların çoğunda net etki, hücre döngüsünün G1'den S fazına yayılması ve söz konusu klon için seçici bir ilerleme ile sonuçlanan siklin D proteinlerinin teşvik edilmesidir (85). IgH dahil translokasyonların hastalık prognozu için farklı etkileri vardır ve myelom hastalarının

incelenmesinde IgH yeniden düzenlenmesinin değerlendirilmesi araştırmacılar tarafından önerilmektedir (88).

Kromozom 11q13 (CCND1) ve kromozom 14q32 (IgH) arasındaki translokasyon (11;14) en yaygın olanıdır, miyelom hastalarının % 15-20'sinde bulunur, CCND1'in düzenlenmesi ve hücre döngüsünün desteklenmesi ile sonuçlanır (74). Myelomda t(11;14)'ün prognostik bilgisi hakkında kesin bir bilgi bulunmamasına rağmen, genel olarak nötr bir etkiye sahip olduğu kabul edilir. Ancak t(11;14) translokasyon ve CCND1 mutasyonlarının bir arada meydana gelmesinin kötü prognoz ile ilişkili olduğuna dair göstergeler bulunmaktadır (87,89).

Diğer yaygın olan t(4;14) translokasyonu şifrelidir ve geleneksel metafaz sitogenetiği tarafından tespit edilemez. Bu nedenle tespit için FISH veya polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi moleküler tanı yöntemleri kullanılmalıdır (83). Translokasyon (4;14), kromozom 4p16'dan MMSET ve FGFR3 genlerini, bu genlerin aşırı eksprese edildiği 14q32 IgH enhancer bölgesi yan yana getirir (90). Translokasyon sonucunda kromozom 4 üzerinde bulunan iki genin lokasyonları değişir. MMSET kromozom 4 üzerinde kalırken, FGFR3 kromozom 14'e yer değiştirir (85). Histon modifikasyonu yoluyla epigenetik düzenlemeyi etkileyen MMSET, bu translokasyonların % 100'ünde ifade edilirken, onkogenik bir reseptör tirozin kinaz olan FGFR3'ün sürekli ifadesi % 75'inde tespit edilmektedir (83,91). Yapılan çalışmalarla translokasyon t(4;14), hem progresyonsuz sağkalım hem de genel sağkalım açısından kötü bir sonuçla ilişkilendirilmiştir (90,92).

b. Hiperdiploidi

Hiperdiploidi hastalarında 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 ve 21 numaralı kromozomlarda trizomiden ötürü tek sayıda kromozom kazancı vardır ve hücreler toplamda 48 ila 75 arasında kromozom barındırır. Hiperdiploidinin arkasındaki mekanizma kesin olarak bilinmemektedir. Ancak önde gelen hipotez, tüm kromozom kazanımlarının, bir seferde bir kromozomun ardışık kazanımı yerine, başarısız bir mitoz sırasında meydana gelmesidir (74). Hiperdiploidi hastaları heterojen bir gruptur ancak genel olarak IgH translokasyonlu hastalara göre daha iyi prognoza sahiptirler. Hiperdiploidi, IgG kappa myelomu ile daha sık ilişkilidir ve hastalar, IgH translokasyonları olan hastalara kıyasla genel olarak daha yaşlıdır (83). Muhtemel bir başlangıç vuruşu olarak tek sayıda kromozom kazanımlarına ek olarak, bu hastalarda sıklıkla ikincil vuruşlar olarak ek

translokasyonlar bulunur. En yaygın olanları del1p, +1q, del17p ve 8q24'teki MYC lokusu dahil translokasyonlar ve amplifikasyonlardır (93).

c. İkincil (sekonder) Translokasyonlar

IgH translokasyonları ve kromozom hiperdiploidilerine ek olarak, tanı anında ve daha sonra hastalık ilerledikçe artan kromozomal materyal kazanımları ve kayıpları görülmektedir. 8q24'te MYC'yi içeren translokasyonlar, yeni teşhis edilen hastaların % 18'ine ve relaps ortamındaki hastaların % 50'sine kadar varan oranda myelomda sıklıkla görülmektedir (83,87). MYC'nin bir dizi translokasyon ortağı vardır ve MYC'de meydana gelen bu yeniden düzenlemeler, kötü prognozla ilişkilidir. En yaygın translokasyon ortakları, immünoglobulin ağır ve hafif zincir genleri IgH, IgL ve IgK'nın yanı sıra myelomda sıklıkla yer alan FAM46C genidir (87).

2.2.2.2. Somatik Mutasyonlar

Yeni nesil dizileme yöntemleri kullanılarak multiple myelomada bir dizi tekrarlayan somatik mutasyon tanımlanmıştır (87). Şimdiye kadar, hastalığa özgü bir gen mutasyonu tanımlanmamıştır, ancak tekrarlayan mutasyonlara uğramış sürücü genlerin bir kısmı tanımlanmıştır. Sıklıkla mutasyona uğrayan genler, MAPK ve NFKB sinyal yollarının yanı sıra DNA onarımı ve hücre döngüsü dahil olmak üzere çeşitli hücresel işlevlerde görev alırlar. KRAS ve NRAS'taki mutasyonlar hastaların % 50'sinde gözlenir (93). KRAS ve NRAS, geniş bir tümör spektrumunda mutasyona uğrayan ve RAS/MAPK sinyal yolağında hücre içi sinyalleşmeyi etkileyen onkogenlerdir. RAS/MAPK yolunun aktive olması; hücre farklılaşmasını, çoğalmasını ve hayatta kalmasını etkileyen gen ekspresyonlarını değiştirir. BRAF da bu sinyal yolunun bir parçasıdır ve miyelom hastalarının % 10'unda mutasyona uğrar. BRAF mutasyonları öncelikle tüylü hücreli lösemide olduğu gibi kodon 600'de (V600E) bulunur, ancak ek mutasyonlar da gözlenmiştir (87,93).

NFKB yolu, gen transkripsiyonu ve hücre çoğalmasıyla sonuçlanan miyelom hücrelerinde yukarı doğru düzenlenir. Bu sinyal yolunda yer alan bir dizi gende meydana gelen sık mutasyonlarda miyelom oluşumunda önemlidir (örn., TRAF3, CYLD, MAP3K14, BIRC2, BIRC3, IKBKB ve daha fazlası) (87,94).

DNA onarım mekanizmaları; somatik mutasyonlar, P53'ün gen delesyonları ve kromozom 17'nin kısa kolundaki delesyonlar tarafından değiştirilir. 17p bölgesini etkileyen mutasyonlar ve delesyonlar hastalık ilerledikçe daha sık hale gelir ve kötü

prognozla ilişkilendirilir (74). P53 ile aynı DNA onarım mekanizmasının parçası olan ATM ve ATR'deki mutasyonlar ve delesyonlar myelomda da yaygın olarak görülmektedir (87).

2.2.2.3. Kemik İliği Mikroçevresi

Multiple myelom hücreleri ve kemik iliği mikro ortamı arasındaki etkileşim, myelom gelişimi, tedavisi ve ilerlemesi için çok önemlidir. Mikro çevreyi hematopoietik hücreler (B hücreleri, T hücreleri, doğal öldürücü hücreler, myeloid türevi baskılayıcı hücreler ve osteoklastlar-kemik erimesinde rol oynarlar dahil-) ve hematopoietik olmayan hücreler (kemik iliği stromal hücreleri dahil) osteoblastlar (kemik oluşumunda rolü olan) ve endotel hücreleri birlikte oluşturur. Bu hücreler topluca multiple myelom hücrelerinin göçüne ve proliferasyonuna ayrıca kemik hasarına da katkıda bulunabilen birkaç faktör salgılar (95).

Çoklu myelom hücrelerinin kemik iliğine göçü, olgun plazma hücrelerinin göçüne benzerlik gösterir. Bu hücreler yüzeylerinde kemokin reseptörü olarak bilinen CXC-tip 4'ün (CXCR4) artmış ekspresyonunu içerirler (96). Endotel hücreleri, multiple myelomun hücre göçünde önemli bir role sahiptirler. Bu hücreler hücre dışı siklofilin A (peptidil-prolil cis-trans izomeraz A) salgılar ve multiple myelom hücrelerinin yüzeyinde bulunan CD147'ye (basigin-BSG-olarakda bilinir) bağlanarak migrasyona katkıda bulunur (97). Kemik iliğinde ilk klonun oluşumu, mikrometastatik yolla kemik iliğinde kolonize olan multiple myelom hücrelerinin lokaslizasyonu olarak tanımlanmıştır (98).

Multiple myelomlu hastalardaki yaygın kemik hastalığı, artan aktivite ve osteoklast sayısından bununla beraber azalmış aktivite ve osteoblast sayısından kaynaklanır. Multiple myelom hücrelerinin kemik iliği stromal hücreleri ve osteoblastlar ile etkileşimi, RANKL üretiminin artmasına ve osteoprotegerin düzeylerinin azalmasıyla sonuçlanır (99). RANKL, preosteoklastlar tarafından ifade edilen RANK'a (NF- κ B'nin reseptör aktivatörü; ayrıca TNFRSF11A olarak bilinir) bağlanır ve osteoklastlarda artan farklılaşmaya neden olur. Osteoprotegerin, tuzak bir RANK reseptörüdür; bu faktörün azalmış seviyesi, farklılaşmaya neden olan RANKL düzeyini yükseltir (100). Osteoklastların ve osteoblastların sayı ve aktivitelerindeki bir dengesizlik, kemiğin tahrip olmasına ve kemik hastalığının gelişmesine neden olur (95). Mikro çevre ve multiple myelom hücreleri arasındaki etkileşimde, eksozomların bir rolü olduğu bilinmektedir. Hastalarda, kemik iliği stromal hücrelerinden alınan eksozomlar, sağlıklı bireylerden

alınan eksozomlara kıyasla bazı miRNA'lar (miR-15a) daha düşük seviyede ekspresyona sahiptir (101). Bu durum tümör büyümesini ve gelişimini etkilemektedir, çünkü miR-15a aralarında BCL2, CCND1 ve CCND2 gibi genlerle birlikte bir tümör baskılayıcı görevi görmektedir (102,103).

2.2.3. Tanı ve Tedavi

Multiple myeloma (MM), yakın zamana kadar patolojik ve klinik özelliklerin bir kombinasyonuna dayalı olarak tanımlanmaktaydı. Spesifik olarak, neoplastik plazma hücre klonunun gösterilmesine ek olarak, tanı için altta yatan klonal sürece ek olarak bazı uç organ hasarının (hiperkalsemi, böbrek yetmezliği, anemi veya CRAB özellikleri olarak adlandırılan kemik lezyonları) varlığı da gereklidir (104,105). Neoplastik klonu olan ve uç organ hasarı olmayan hastalara, kemik iliği plazmasitozunun derecesine veya monoklonal protein (M) düzeyine bağlı olarak, önemi belirsiz monoklonal gamopati (MGUS) veya için için yanan multiple myelom (SMM) tanısı koyulmuştur. MGUS ve SMM bozuklukları maligniteye ilerleme riskine göre bölünmüştür ve bu ayrım klinik bakım, danışmanlık, prognostik değerlendirme ve hastalık seyrinin yönetimi için kritiktir. SMM, MGUS'tan (yılda yaklaşık % 1) çok daha yüksek maligniteye (yılda yaklaşık % 10) ilerleme riski taşır (93).

1990'ların sonlarına kadar, MM'yi tedavi edecek çok az ilaç vardır ve mevcut olanlar da (alkilatörler ve kortikosteroidler) çok etkili değildi ve uzun vadeli riskler taşımaktaydı. 2014 yılında, Uluslararası Myelom Çalışma Grubu (IMWG), MM'nin hastalık tanımını, son organ hasarı oluşmadan önce erken tanıyı mümkün kılmak için revize etmiştir (88). İlk olarak, MM'yi tedavi etmek için birkaç yeni yüksek derecede aktif ilaç mevcuttur ve bu ajanlar MM'li hastaların sağkalımını iki katından fazla artırmıştır (110). İkinci olarak, 2 yıl içinde MM'ye ilerleme olasılığı yüksek ($\geq$ % 80) veya MM'ye ilerleyen SMM'li hastaları doğru bir şekilde ayırt eden spesifik biyobelirteçler belirlendi, böylece gerçek MGUS'lu hastalar ile sadece en yüksek riske sahip hastalara tedavi verme fırsatı sağladı (106). Üçüncüsü, özellikle düşük doz tüm vücut bilgisayarlı tomografisi (BT) ve pozitron emisyon tomografisi/bilgisayarlı tomografik taramalar (PET/BT) olmak üzere, hastalığı erken saptamak için gelişmiş görüntüleme modelleri kullanılabilir hale geldi. Bu aynı zamanda, gözlemlenen hastalara, kemik lezyonları hala küçük ve tahribatsız olduğunda potansiyel olarak teşhis konabileceği anlamına gelmektedir (107). Son olarak, İspanyol Myelom Grubu tarafından yüksek riskli SMM'li hastalarda yürütülen randomize bir

çalışma, lenalidomid ve düşük doz deksametazon (Rd) ile erken tedaviye göre bir hayatta kalma avantajı göstermiştir (93). Son olarak, İspanyol Myelom Grubu tarafından yüksek riskli SMM'li hastalarda yürütülen randomize bir çalışma, lenalidomid ve düşük doz deksametazon (Rd) ile erken tedaviye göre bir hayatta kalma avantajı göstermiştir (108). Son yirmi yılda MM tedavisinde büyük ilerlemeler gösterildi ve bu da genel sağkalımın artmasına yol açtı. Tipik olarak, myelom hastaları, değişken süreli bir remisyon fazını indükleyen otolog kök hücre transplantasyonunu izleyen bir indüksiyon kemoterapisi döngüsüne tabi tutulmaktadır. Çoğu durumda, bu aşamayı hastalığın nüksetmesi izler, bu da ikinci basamak tedavinin kullanılmasına ve ardından tedavisiz remisyon aşamasına yol açar. Bu döngü genellikle devam eder ve her remisyon fazı, antimyelom ilaçları hastalığın ilerlemesini durduramayana kadar giderek kısalır (109). Tablo 2.4'de Uluslararası Myelom Çalışma Grubuna ait multiple myelom ve ilgili plazma hücre bozuklukları için tanı kriterleri verilmiştir (93).

Tablo 2-4: Uluslararası Miyelom Çalışma Grubu, multipl miyelom ve ilgili plazma hücre bozuklukları için tanı kriterleri (110)

Hastalık	Tanı
Önemi belirsiz IgM olmayan monoklonal gamopati (MGUS)	Üç kriterin tümü karşılanmalıdır: - Serum monoklonal proteini (IgM olmayan tip) <3 gm/dL - Klonal kemik iliği plazma hücreleri < %10a - Plazma hücresi proliferatif bozukluğuna atfedilebilecek hiperkalsemi, böbrek yetmezliği, anemi ve kemik lezyonları (CRAB) gibi son organ hasarının olmaması
İçten yanmalı multiple myeloma (SSM)	Her iki kriter de karşılanmalıdır: - Serum monoklonal proteini (IgG veya IgA) ≥ 3 gm/dL veya 24 saatte ≥ 500 mg idrar monoklonal proteini ve/veya klonal kemik iliği plazma hücreleri %10-60 - Myelom tanımlayan olayların veya amiloidozun olmaması
Multiple Myeloma (MM)	Her iki kriter de karşılanmalıdır: - Klonal kemik iliği plazma hücreleri ≥ 10 veya biyopsi ile kanıtlanmış kemik veya ekstremiteler plazmasitoma - Aşağıdaki miyelom tanımlayan olaylardan herhangi biri veya birkaçı: - Altta yatan plazma hücresi proliferatif bozukluğuna atfedilebilecek uç organ hasarının kanıtı, özellikle: - Hiperkalsemi: serum kalsiyumu $> 0,25$ mmol/L (> 1 mg/dL) normalin üst sınırından yüksek veya $> 2,75$ mmol/L (> 11 mg/dL) - Böbrek yetmezliği: kreatinin klerensi < 40 mL/dakika veya serum kreatinin > 177 μmol/L (> 2 mg/dL)

	Anemi: Normalin alt sınırının >2 g/dL altında hemoglobin değeri veya <10 g/dL hemoglobin değeri Kemik lezyonları: iskelet radyografisi, bilgisayarlı tomografi (BT) veya pozitron emisyon tomografisi-CT (PET-CT) üzerinde bir veya daha fazla osteolitik lezyon – Klonal kemik iliği plazma hücre yüzdesi $\geq 60\%$ – Dahil: karışmamış serum serbest hafif zincir (FLC) oranı ≥ 100 (ilgili serbest hafif zincir seviyesi ≥ 100 mg/L olmalıdır) – Manyetik rezonans görüntüleme (MRI) çalışmalarında >1 odak lezyonu (en az 5 mm boyutunda)
--	--

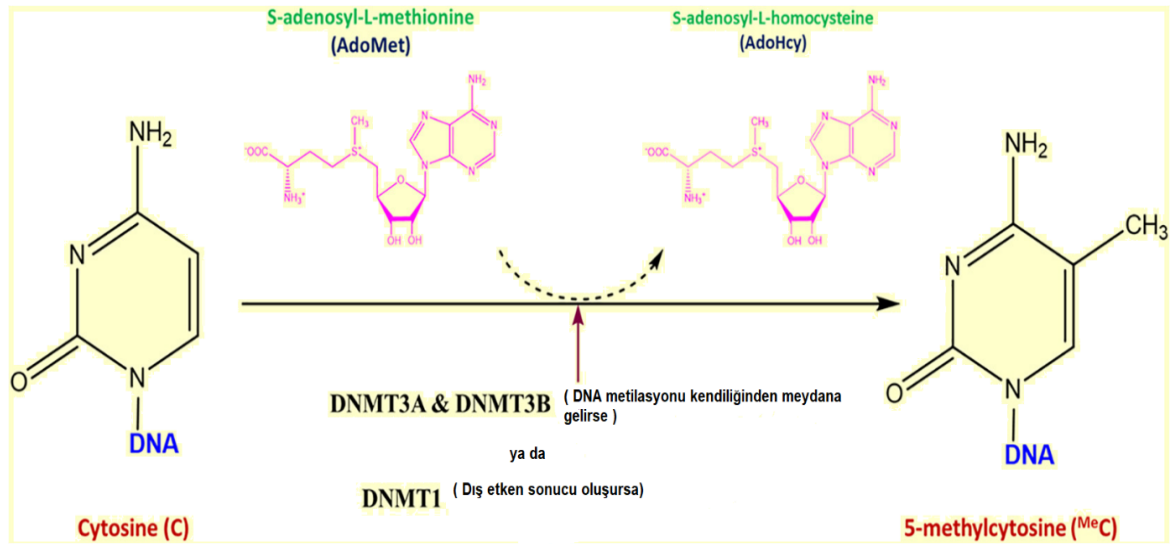
2.3. DNA Metilasyonu

İlk bulunan ve üzerinde en fazla çalışma yapılan epigenetik değişiklik DNA metillenmesidir (111,112). Sitozin nükleotidinin metillenmesi, gen ifadesi ile direkt bağlı olup birçok ökaryot canlıının gelişiminde, normal ve hastalık durumunda büyük rol oynar (113). DNA metilasyonu, S- adenzilmetiyonundaki (SAM) bir metil (-CH₃) grubunun hücre genomundaki bir sitozen nükleotidine kovalent bağıyla eklenerek metilsitozini oluşturması olarak tanımlanabilir (114). Memeli hücrelerde DNA metilasyonu genellikle CpG dinukleotidindeki sitozenin pirimidin halkasının 5. karbonuna olur (115). CpG adacıkları, genellikle genlerin promotor bölgelerinde bulunan 0,5-3 kb (genellikle 200 baz çiftinden uzun) uzunluğundaki CpG dinukleotince zengin bölgelerdir (CpG frekansı en az 0,6'dır) (116). Yapılan son araştırmalarda promotor bölgesindeki CpG adacıkları gibi genin yapısında bulunan CpG adacıklarının metilasyonunda transkripsiyonel aktiviteyi etkilediği bulunmuştur (117). DNA metilasyonu, genellikle genetik suskunluğa sebep olmaktadır (118). DNA'nın metilasyonunu, DNA metiltransferaz (DNMT) enzimleri tarafından metil bağlanma proteinleri yardımıyla (MBD1, MBD2, MBD3 vb.) katalizlenir (119,120). Şimdiye kadar çok sayıda DNMT (DNMT1p, DNMT1b, DNMT1o, DNMT1p, DNMT2, DNMT3A, DNMT3b, and DNMT3L) tanımlanmıştır (121). Memelilerde en fazla bulunan DNMT1 yarı metillenmiş (bir zincirdeki CpG metillenmiş, diğer zincirdeki ise metillenmemiş) DNA'nın metillenmesinde katalizler (122). Katalitik aktiviteye sahip olan DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B aksine DNMT3L metiltransferaz aktivitesi göstermezler (Şekil 2.1) (123).

Metilasyon oranı, genomdaki tekrar dizilerinin ve transpozonların CpG bölgelerinde yüksek olduğu için transkripsiyon baskılanır ve transpozonların genom içerisindeki hareketi engellenerek kromatin kararlılığı korunur (124,125). DNA hipermetilasyonu,

DNA onarım mekanizmasında görevli enzimleri kodlayan genleri, sinyal iletiminde görevli genleri, hücre döngüsü düzenleyicisi olarak görevli genleri, apoptozda görevli genleri ve detoksifikasyonda görevli genleri inaktive ederek karsinogeneze katkıda bulunur. DNA hipometilasyonunda ise, onkogen aktivitesi artışı, transpozon hareketleri artışıyla birlikte genomik kararlılığın kaybolmasıyla imprinting kaybı durumlarıyla karsinogeneze katkıda bulunulur.

Şekil 2-1: DNA metilasyonu kimyasal gösterimi (126).

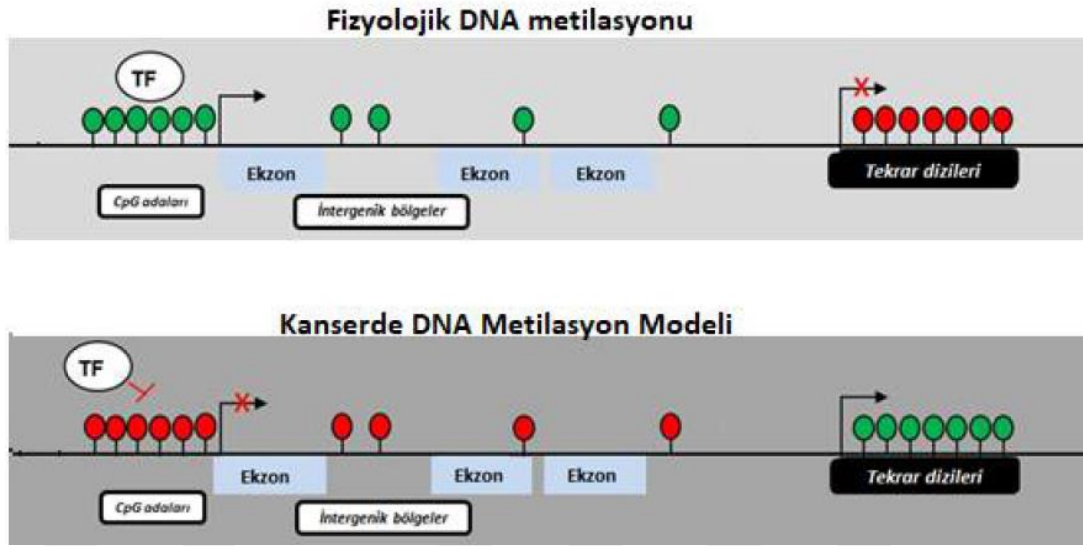


2.3.1. DNA Metilasyonu ve Kanser İlişkisi

DNA metilasyonu ve kanser arasındaki ilişki ilk kez 1983 yılında ortaya konmuştur. Burada, kanserli hücre genomlarının normal hücre genomlarına göre hipometile bir yapı olduğu gösterilmiştir. DNA'nın hipometilasyonu onkogenleri aktive eder ve transpozon hareketliliğini artırır. Dolayısıyla bu süreç genomik kararsızlığa neden olup kansere neden olur (125). Onkogenlerin aktivasyonu ya da tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonunu yitirmesi gibi nedenler kontrolsüz büyüme ve metastaz yapabilme yeteneğine sahip olan kanser hücrelerinin meydana gelmesine yol açmaktadır (127). DNA metilasyonu, kanser mekanizmasının tetiğinin çekilmesinde, ilerlemesinde ve metastaz yapmasındaki süreçte etkili olan bir epigenetik mekanizmadır (128). Metilasyonu düzenleyen DNMT ve MBD genlerindeki mutasyonlar; meme, mide ve akut myeloid lösemi gibi kanserlerin oluşumunda etken olduğu bilinmektedir. Anormal DNA metilasyonun; hipermetilasyon,

hipometilasyon ve baskılama kaybı (loss of imprinting) olmak üzere üç türü vardır (129). Ayrıca, global DNA hipometilasyonu ve promotör DNA hipermetilasyonu olmak üzere kanserde iki şekilde etkili olmaktadır (128). Global hipometilasyon normalde suskun olan genlerin aktive etmek ve kromozomal kararsızlığa (chromosomal instability) sebep olmak suretiyle tümör gelişimine sebep olabilir. Ayrıca tümör gelişimi boyunca hipometilasyon derecesi artmaktadır (130,131). Gen promotör bölgelerinde bulunan CpG adacıklarının hipermetilasyonu ise kanserde en fazla çalışılan epigenetik değişikliktir. Tümör supressor genler gibi kanser oluşumunda rol alan genlerin CpG adacıkları hipermetillendiğinde, genler inaktif forma geçer ve kanser oluşumuna sebebiyet verebilir (132). Global DNA metilasyonunun azalması özellikle de prostat, baş-boyun, hepataselüler ve beyin kanseri oluşumu ile ilişkili bulunmuştur. Genlerin promotör bölgelerinin hipermetilasyonunun kanserle olan ilişkisi ise promotör bölgelerinde bulunan CpG adalarının hipermetile olması şeklinde belirtilmiştir (133). Yeni nesil Dizileme (NGS-Next Generation Sequence) gibi yeni yöntemler kullanılarak yapılan araştırmalar sonucunda normalde metillenmemiş durumdaki CpG adacıklarının % 5 ila % 10'unun çeşitli kanser türlerinde anormal metillendiği gösterilmiştir (134). CpG adacıklarının hipermetilasyonu DNMT enzimlerinin aşırı ifade edilmesi suretiyle olmaktadır. Meme, over ve mesane gibi kanser türlerinde DNMT enzimlerinin aşırı ifade edildiği rapor edilmiştir. Bu durum DNMT enzimlerini kanser tedavi yöntemi geliştirilmesinde yeni hedef haline getirmiştir. DNMT inhibitörü olarak 5-azadeoksisitidin (5-azadeoxycytidine) ve zebularine gibi ajanlar kullanılmaktadır (135). DNMT inhibitörü kullanılarak meme, miyeloid lösemi gibi kanserlerde hipermetilasyon sebebiyle susmuş olan genlerin tekrar aktive edilebildiği rapor edilmiştir (136). Şekil 2.2'de kanserdeki DNA modeli gösterilmiştir.

Şekil 2-2: Kanserdeki DNA Modeli



Üstteki görsel, CpG'lerin transkripsiyona uğradığı (yeşil) transkripsiyonel aktiviteye izin veren sağlıklı durumu gösterirken, tekrarlayan bölgeler yoğun metillenmiş (kırmızı) halde tutulur. Bu tablo, kanserde tersine döner; metillenmemiş (yeşil) tekrarlayan bölgelerde metilasyon kaybıyla birlikte promotörlerdeki CpG adacıkları yoğun şekilde metillenir (kırmızı). Tekrarlayan dizilerdeki bu metilasyon kaybı, bu bölgelerin aktifleşmesine ve genom kararsızlığına yol açar (137).

Kanserlerde, DNA hipometilasyonu onkogenleri aktive ederek kromozom kararsızlığını başlatırken, DNA hipermetilasyonu tümör baskılayıcı genlerin susturulmasına yol açar. DNA hipermetilasyonunun gözlemlendiği CpG adacıklarını yoğun şekilde içeren kanser dokuları, 'CpG adası metilatör fenotip,' (CIMP) olarak adlandırılmıştır ve son on yılda mesane, meme, endometriyal, gastrik, glioblastom, hepatosellüler, akciğer, yumurtalık, pankreas, prostat, renal hücre kanserleri, lösemi, melanom, duodenal adenokarinom, adrenokortikal karsinom ve nöroblastom gibi çeşitli tümör tiplerinde tanımlanmıştır (138). Gen spesifik metilasyon değişiklikleri dışında, genomun tekrarlayan elementlerinde (ör. LINE-1) metilasyon düzeyleri kanserogenez sürecinde azalır (hipometilasyon). LINE-1 elementindeki metilasyon değişiklikleri çeşitli kanser tipleri (kolon, testis, kolon, mesane, mide, baş-boyun ve nöroendokrin tümörler) ile sistemik lupus eritematozus ve nöral tüp defektlerinin gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Tekrar elementlerindeki metilasyon durumu, genellikle global DNA metilasyon seviyelerini tahmin etmek için belirteç olarak kullanılır (137,139).

2.4. Multiple Myeloma ve Epigenetik

Kanserde DNA metilasyon çalışmaları, MM dahil olmak üzere malign hücrelerin genel olarak global bir DNA hipometilasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyonu ile karakterize olduğu sonucuna varmıştır (140,141). Global hipometilasyonun, mevcut metioninin ayrışmasından kaynaklandığı ve bunun genom çapında DNA metilasyonu kaybına böylece de genomik kararsızlığa neden olduğu öne sürülmüştür (142). MM'de global DNA hipometilasyonu, hastalığın ilerlemesi ve kötü prognoz ile ilişkilidir (143). Bazı çalışmalar ile, MM'de spesifik genlerin hipometilasyonu rapor edilmiştir; NOTCH ligandı olan JAG2 geninin promotör hipometilasyonu, hem MGUS hem de MM hastalarından alınan malign plazma hücrelerinde ve ayrıca MM hücre dizilerinde bildirilmiştir. JAG2'nin stromal hücrelerde IL-6, VEGF ve IGF-1 salgılanmasını arttırdığı bilinmektedir, bu da JAG2 promotörünün DNA hipometilasyonunun MM patogenezinde erken bir olay olabileceğini düşündürmektedir (144). Öte yandan, birkaç çalışma, MGUS ve MM'de hücre döngüsü, DNA onarımı, apoptoz ve anahtar sinyal yollarının düzenlenmesinde rol oynadığı bilinen tümör baskılayıcı genlerde (p16, APC, SHP1, DAPK, BCL2/BNIP3, CDH1(E-CAD), GJA1, MGMT gibi) DNA hipermetilasyonunun yaygın olduğunu göstermiştir (143).

2.5. JAK/STAT Sinyal Yolağı

Sitokinler; hematopoez, bağışıklık, yara iyileşmesi ve sinir sisteminin gelişimi gibi temel biyolojik süreçleri düzenleyen belirli hücreler tarafından salgılanan geniş bir glikoprotein ailesi üyeleridir. Sitokinlerin temel görevi hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak biyolojik bilgiyi hedef hücrelere iletmektir. Sitokin reseptörleri, intrinsik kinaz aktivitesinden yoksundurlar. Bununla birlikte çoğu zaman, TYK2, JAK1, JAK2 ve JAK3'ü içeren Janus kinaz (JAK) olarak bilinen tirozin kinaz ailesinin üyeleri ile yapısal olarak ilişkilidirler. Sitokin bağlanması, reseptör agregasyonunu indükler, bu da JAK'ların yan yana gelmesine ve çapraz fosforilasyon yoluyla aktivasyonlarına neden olur (145,146).

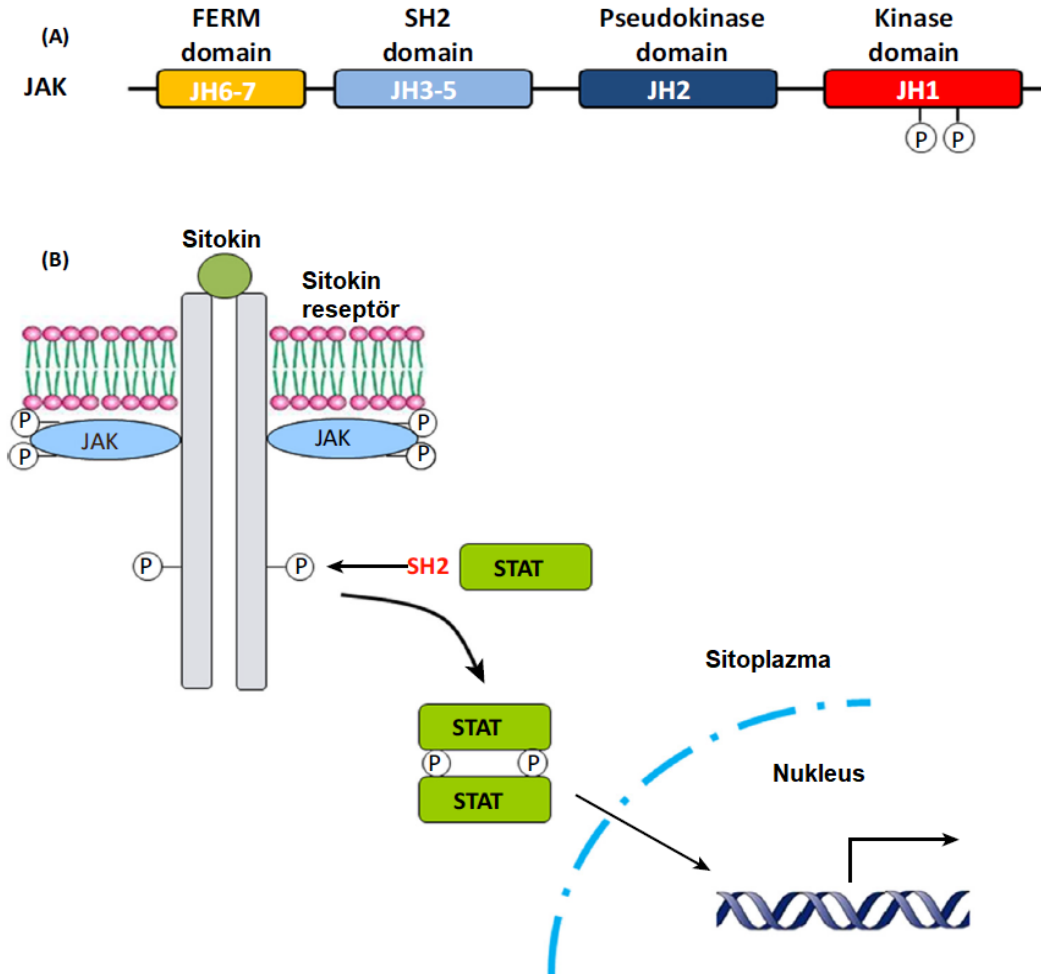
Aktive olmuş JAK'lar, sitokin reseptörlerinin sitoplazmik alanındaki çoklu tirozin kalıntılarını fosforile ederek, Src-homoloji 2 (SH2) veya fosfotirozin bağlama (PTB) alanlarını içeren sinyal proteinleri için güçlendirme alanları yaratır. Src-homoloji 2 (SH2), Src onkoproteinleri içinde korunmuş bir dizi bölgesi olarak tanımlanan yaklaşık 100 amino asit kalıntısından oluşan bir protein alanıdır. SH2 alanları, bu alanları içeren

proteinlerin diğ er proteinler üzerindeki fosforile edilmiş tirozin kalıntılarına bağlanmasına izin verir. Ayrıca SH2 alanları yaygın olarak reseptör tirozin kinaz yollarının sinyal iletimine yardımcı olan adaptör proteinlerde bulunur (147). Bu şekilde sitokin uyarımı, RAS, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K), fosfolipaz C-y ve sinyal transdüserleri ve transkripsiyon aktivatörlerini (STAT'ler) içeren çoklu sinyal transdüksiyon basamaklarını başlatır. Bu çeşitli sinyal transdüksiyon basamakları da birlikte çekirdekte gen ekspresyonunun düzenlenmesiyle; hedef hücre farklılaşmasına, çoğalmasına, hayatta kalmasına, apoptoz veya hücre aktivasyona yol açar (145,146).

STAT transkripsiyon faktörleri ailesi, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b ve STAT6'dan oluşur. STAT ailesi üyelerini kodlayan genlerin hedeflenerek bozulması, STAT'lerin sitokin kaynaklı birçok biyolojik tepki için gerekli olduğunu ortaya çıkarmıştır. STAT proteinleri, SH2 alanları aracılığıyla tirozin-fosforile edilmiş sitokin reseptörlerine bağlanır ve JAK'lar tarafından spesifik C terminal tirozin kalıntıları üzerinde fosforile olur. Fosforillenmiş STAT'ler daha sonra reseptörden ayrılır ve SH2 alanları aracılığıyla homo- veya heterodimerler oluşturur. Oluşan STAT dimerleri hemen, hedef genlerin promotörlerindeki spesifik DNA dizilerine bağlandıkları ve böylece transkripsiyonu düzenledikleri çekirdeğe girerler (145,148).

Aşırı stimülasyonun zararlı sonuçlarından kaçınmak için sitokin kaynaklı sinyal iletim yolları sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Son zamanlarda, en az üç farklı inhibitör sınıfının sitokin sinyalleme sinin negatif düzenlenmesine katkıda bulunduğ u netlik kazanmıştır: SHP-1 ve CD45 gibi protein tirozin fosfatazlar, aktive edilmiş STAT'lerin (PIAS) protein inhibitörleri ve sitokin sinyalleme sinin baskılayıcısı SOCS proteinleri (145).

Şekil 2-3: Janus Kinaz (JAK) Sinyal Dönüştürücünün Yapısı, Aktivasyonu ve Transkripsiyon Aktivatör (JAK-STAT) Sinyalleşmesi



(A)Tüm JAK izoformlarında ortak olan etki alanı yapısı. Kinaz aktivitesi için gerekli JAK-homolojisi (JH)1 alan aktivasyon döngüsü içindeki tirozin (Tyr) fosforilasyon bölgelerinin yerleri gösterilmektedir. Bunlar Tyr1034,1035 (insan JAK1), Tyr1007,1008 (insan JAK2), Tyr980,981 (insan JAK3) ve Tyr1054,1055 (insan Tyk2)'ye karşılık gelir. (B) Bir sitokinin membrana bağlı reseptör kompleksi ile etkileşimi reseptöre bağlı JAK'ların aktivasyonunu tetikler, bu da daha sonra reseptörü anahtar sitoplazmik Tyr kalıntıları üzerinde fosforile eder. Bunlar, STAT proteinleri ile SH2 alanı aracılı etkileşimler için yerleştirme yerleri olarak işlev görür. JAK'lar, C terminal alanlarındaki tek bir Tyr kalıntısı üzerinde toplanan STAT'leri fosforile eder, bu da STAT'lerin reseptörden ayrılmasını ve dimerleşmesini sağlar. Dimerik STAT kompleksleri daha sonra çekirdeğe yer değiştirir, hedef DNA'yı bağlar ve gen transkripsiyonunu başlatır. Kısaltmalar: FERM, N terminal 4.1, ezrin, radixin, moesin (149).

JAK'lar, interlökinler (IL'ler), interferonlar (IFN'ler) ve leptin gibi hormonların uyarılmasında görevli reseptörleri içeren tip I ve tip II sitokin reseptörleri ile etkileşime girer. Bu reseptörler hiçbir içsel enzimatik aktiviteye sahip olmadıklarından, aşağı akış sinyalleşmesi için farklı JAK izoformları ile etkileşim içinde olmaları gereklidir. Örneğin,

gp130 (IL-6 reseptör kompleksinin sinyal dönüştürücü bileşeni) JAK1–2 ve Tyk2 ile birleşirken IL-2 reseptör kompleksleri özellikle JAK1 ve JAK3 ile ilişkilidir (150). Her JAK proteini, yedi JAK-homoloji (JH) alanı [JH1, kinaz alanı; JH2, psödokinaz (PK) alanı; JH3–5, SH2 alanı (fosfo-Tyr kalıntıları bağlamasa da); ve JH6–7, N terminal 4.1, ezrin, radixin, moesin (FERM) alanı] içermektedir (Şekil 2.3A).

FERM ve SH2 alanları, sitokin reseptörlerinin membran-proksimal box1/2 bölgeleri ile JAK etkileşimine aracılık ederken, PK alanı, kinaz alanını bağlayarak Tyr (tirozin) kinaz aktivitesini sınırlar. Sitokin-reseptör etkileşimi, kinaz aktivitesini açmak için gereken spesifik Tyr kalıntıları üzerinde reseptörle ilişkili JAK'ların fosforilasyonunu tetikler. Yapısal çalışmalar sitokin-reseptör ligasyonunun JAK-reseptör komplekslerini yeniden yönlendirdiğini ve böylece JAK'ların kinaz alanlarında mevcut olan aktivasyon döngülerinin trans-fosforilasyonuna izin verecek kadar yakın hale geldiğini öne sürer (Şekil 2.3A) (149).

Aktive edilmiş JAK'lar, daha sonra SH2 alanı içeren STAT proteinleri için kenetlenme bölgeleri oluşturmak üzere spesifik kalıntılar üzerinde Tyr fosforilat bağlı sitokin reseptörü. Reseptöre bağlı STAT'ler daha sonra reseptörden ayrılmadan ve homo- veya heterodimerlerin oluşumundan önce C terminal alanları içindeki korunmuş Tyr kalıntıları üzerinde fosforile edilir. Bunlar çekirdeğe yer değiştirir, hedef gen promotörlerini bağlar ve hedef gen transkripsiyonunu uyarır (Şekil 2.3B). STAT'ler farklı sitokin reseptörleri ile aktive edilir. Örneğin, gp130 kullanan sitokinler, tercihen Tyr705 üzerinde fosforilasyon yoluyla STAT3'ü aktive ederken, IFN γ reseptörleri Tyr701 fosforilasyonu yoluyla STAT1'i aktive eder (148,149).

2.6. SOCS (Sitokin Sinyalizasyon Baskılayıcı) Gen Ailesi

Sitokin sinyalizasyon baskılayıcı (SOCS) protein ailesi, sitokin ve büyüme faktörü sinyalleşmesinin anahtar negatif düzenleyicileridir. 1990'ların sonlarında keşfedilmelerinden bu yana, bu küçük hücre içi proteinler, hücre içi sinyalleşmenin düzenleyici temel taşları olarak karakterize edilmiştir. Memelilerde sekiz SOCS ailesi üyesi bulunmaktadır. Bunlar sitokinle indüklenebilir SH2 içeren protein (CIS) ve SOCS1-7 olarak sınıflandırılırlar. SOCS ailesi, yüksek oranda korunmuş bir C-terminali SOCS kutu motifi, bir merkezi Src- homoloji 2 (SH2) alanı ve genişletilmiş SH2-alt alanı (ESS) olarak adlandırılan bitişik bir α -sarmal uzantısı ve bir N-terminali bölgesi ile karakterize edilir. Bu bölgeler aile üyeleri içinde sıra ve uzunluk olarak değişir. SOCS kutusu, 26S

proteazomu tarafından substrat proteinlerinin çoklu-ubiquitinasyonuna ve bununla beraber bozunmasına aracılık etmek için bir substrat tanıma modülü görevi görür. SH2 ve ESS alanı, hedef proteinler üzerindeki tirozin-fosforile edilmiş motifleri toplu olarak bağlar. Ek olarak, SOCS1 ve SOCS3, sözde substrat olarak işlev gören benzersiz bir kinaz inhibitör bölgesine (KIR) sahiptir. SOCS4-7, onları SOCS1-3 ve CIS'den (tip II alt ailesi) ayıran geniş bir N-terminal bölgesi (tip I alt ailesi olarak adlandırılır) içerir (151).

2.6.1. SOCS Kutusu

A- Katil hücre immünoglobulin benzeri reseptörler (KIR/CD158):

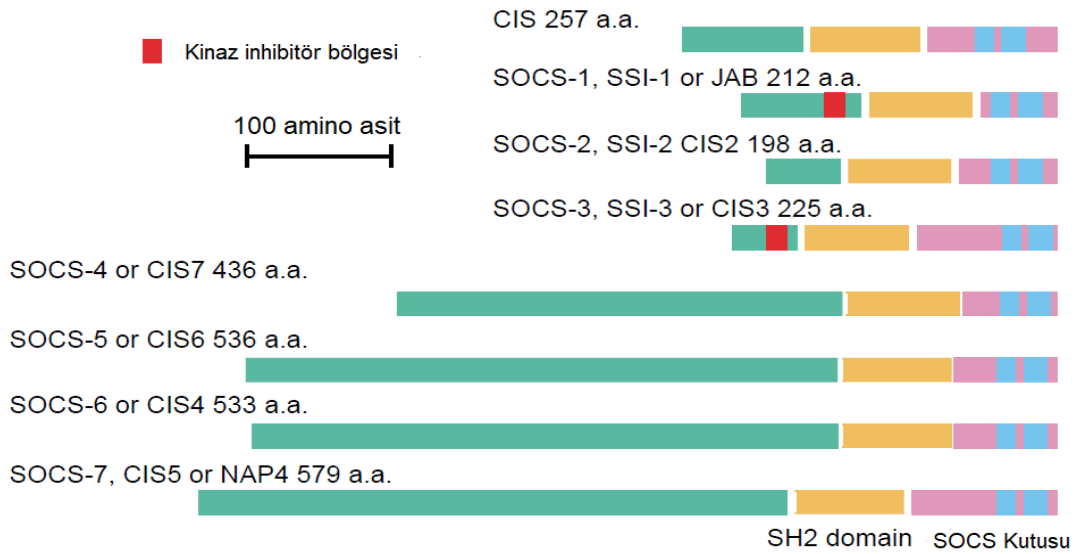
NK (Doğal öldürücü) hücreleri ve T hücrelerinin bir alt kümesi üzerinde eksprese edilen transmembran glikoprotein ailesi üyesidir KIR, NK hücrelerinin gelişmesinin, toleransının ve aktivasyonunun kilit düzenleyicisidir. KIR'ın majör ligandlar, vücuttaki hemen hemen her normal çekirdekli hücrenin yüzeyinden eksprese olan ve insanlarda en polimorfik genler tarafından kodlanan MHC sınıf I (HLA-A, -B veya -C) molekülleridir. NK hücrelerinin normal hücrelere karşı toleransı, KIR, CD94 ve CD85j dahil olmak üzere MHC-I-bağlayıcı inhibitör reseptörlerinin ekspresyonuyla sağlanır. NK hücreleri tercihen, aşağı regüle (down regüle) edilmiş yüzey MHC-I moleküllerine sahip anormal hücrelere saldırır, buna da literatürde "eksik kendini tanıma"(missing self recognition) denir. Bu şekilde NK hücreleri, MHC-I eksikliği olan hedef hücreleri ortadan kaldırmak için müdahale eder. NK hücrelerinin KIR aracılı düzenlemesi, viral enfeksiyon, kanser, hematopoietik kök hücre nakli ve hamilelik sırasında yanıt vermelerini önemli ölçüde etkileyebilir (152).SOCS-1 ve SOCS-3 için kinaz inhibitör bölgesi (KIR)'nin önemi SH2 alanı ile beraber katalitik aktivitenin inhibisyonuyla tirozin kinazlara bağlanması ve tirozin kinazların proteazomal degradasyonunda rol oynamasıdır (153).

B- 26S Proteozom

26S proteozom substrat tanınması için bozunma sinyalleri olan ubiquitin ve onun polimerize formunun substratlara bağlanarak proteinin degradasyonundan sorumludur. 26S proteozom holoenzimdir ve iki alt kompleksden oluşur. Çekirdek partikülün (CP) ve düzenleyici partikülün (RP) kovalent olmayan birleşmesi yoluyla toplanır. Düzenleyici partikül substrat

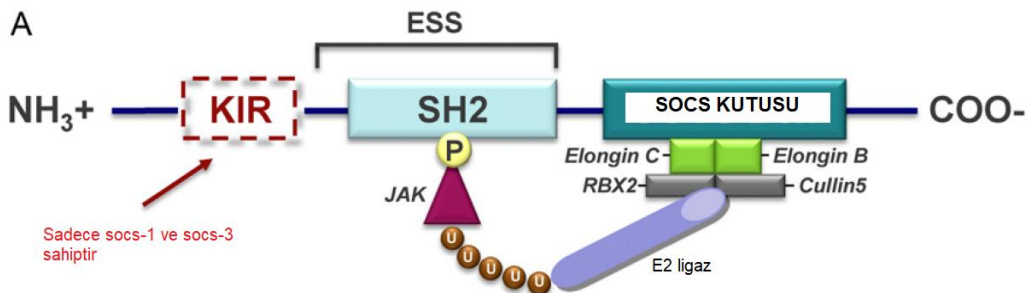
hedefleme, deubiquinasyon, açılma ve yer değiştirmeden sorumlu iken; çekirdek partükülünde RP'nin güvenli açılmasında kontrolü sağlayan kapı görevi görmek ve substrat bozulmasıdır (154). SOCS ailesi için 26S proteozomun önemi SOCS kutusunun substrat tanıma modülü görevi görebilmesi için substrat proteinin çoklu-ubiquitinasyonuna ve bununla beraber bozunmasına aracılık etmesidir.

Şekil 2-4: Sitokin sinyalizasyon baskılayıcı (SOCS) ailesinin moleküler yapısı



SOCS ailesinin başlıca yapısal özellikleri, nispeten iyi korunmuş amino asit dizisine sahip iki alanın varlığıdır: moleküllerin orta kısmında bir Src-homoloji 2 (SH2) alanı ve C terminaline yakın konumdaki SOCS kutusu. Kısaltmalar: CIS, Src homoloji 2 (SH2) içeren protein; JAB, JAK (Janus kinaz ailesi) bağlayıcı protein; NAP4, Nck/Ash bağlayıcı protein 4; SSI-1, STAT (sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü) ile indüklenen STAT inhibitörü-1 (155).

Şekil 2-5: SOCS proteinin yapısı



Tüm SOCS proteinleri, (i) bir merkezi SH2 alanına, (ii) bir uzatılmış SH2 alt-alanı (ESS) dahil olmak üzere değişken uzunlukta bir amino-terminal uç alanına ve (iii) bir karboksi-terminal SOCS kutusuna sahiptir. SOCS1 ve SOCS3, KIR olarak bilinen ek bir amino-terminal kinaz inhibitör bölgesini içerir. Her SOCS'nin SH2 alanı, JAK proteinleri gibi her bir substrata özgü olan fosforile edilmiş (P) tirozin kalıntılarının bağlanması yoluyla hedef özgüllüğünü belirler. SOCS kutusu, elongin B, elongin C, cullin5, RING-box-2 (RBX2) ve E2 ligaz (E2 ubiquitin-konjuge edici enzim olarak da bilinir) içeren bir kompleks ile etkileşime girer. Bu kompleks, bağlı substratı her yerde bulunan makinelere yakın tutar, böylece her yerde bulunmasını (U) kolaylaştırır ve onu proteozomal bozulmaya doğru yönlendirir. KIR alanı, SOCS ile ilişkili proteinlerin kinaz aktivitesini inhibe eden bir psödosubstrat olarak işlev görür (155).

Tablo 2-5: SOCS ailesi üyelerinin en iyi tanımlanmış indükleyicileri, düzenleyicileri (birincil) ve SH2 hedefleri (156)

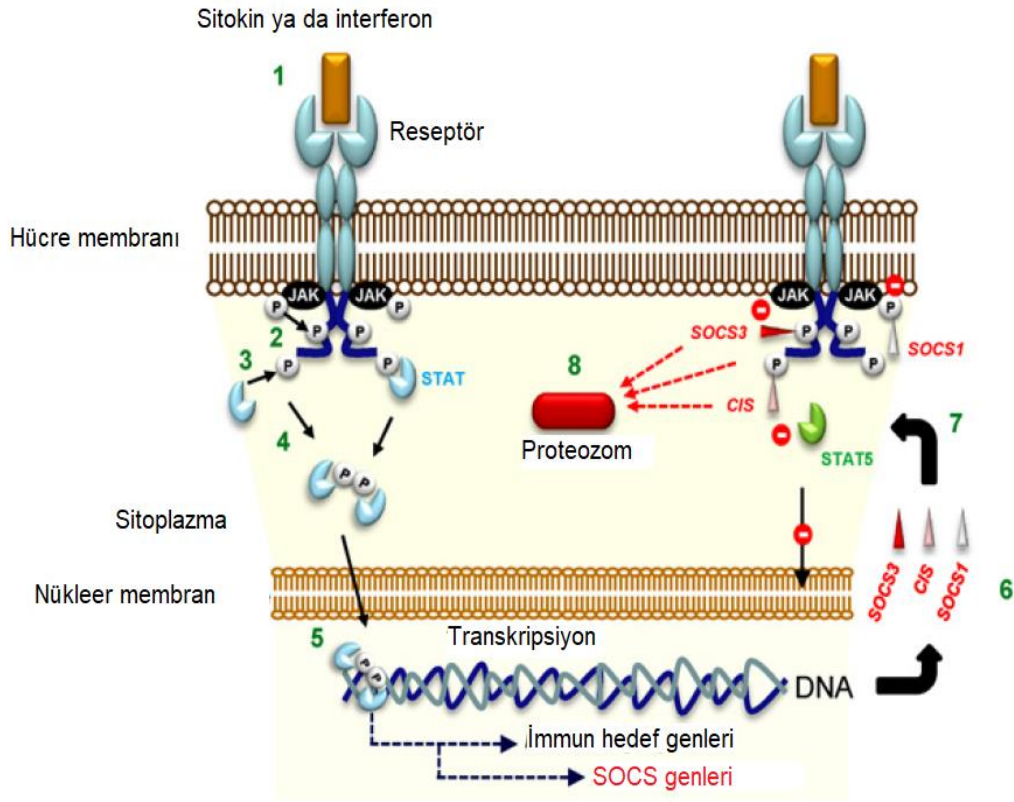
	İndükleyici	Düzenleyici (birincil)	SH2 hedefi
CIS	IL-3, EPO, GH	IL-3, EPO, prolactin, GM-CSF	Reseptör üzerinde STAT5 iyileştirmesi
SOCS-1	IFN-a, IFN-g, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-13, IL-15, LPS, TNF-a, GH, CpG DNA	IFN-a, IFN-g, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, IL-13, IL-15, prolaktin, Epo, OSM, TSLP, TNF-a, Tpo, LIF, LPS	JAK kinazların aktivasyon döngüsünü, IFN-a ve IFN-g reseptörleri üzerindeki fosforile tirozinleri bağlar
SOCS-2	GH	GH, IGF1	Reseptörler üzerinde fosforile tirozinler
SOCS-3	IL-1, TGF-b, IL-6, IL-10, GH, LPS, epidermal büyüme faktörü (EGF)	IL-1, TGF-b, IL-6, IL-11, IL-12, IL-27, G-CSF, leptin, lösemi önleyici faktör (LIF), ocostatin-M (OSM) kardiyotrofin-1 (CT-1), siliyer nötrofik faktör (CNTF) kardiyotrofin benzeri sitokin (CLC)	gp130 ile ilişkili sitokin reseptörlerinin fosforile edilmiş tirozini
SOCS-4	EGF	EGFR	EGFR fosforile tirozin
SOCS-5	EGF	EGFR	?
SOCS-6	Insulin	P85PI3K, IRS, INSR	IRS
SOCS-7	Insulin, IGF	IRS, INSR, IGF	IRS, INSR

2.6.2. SOCS-1 gen ve proteini

JAK bağlayıcı protein (JAB-1) veya STAT ile indüklenen STAT inhibitörü (SSI-1) olarak da adlandırılan aile üyeleri arasında en çok çalışılan SOCS-1'dir (156). SOCS-1, STAT'lara bağımlı ya da bağımsız olan bir sinyal iletim yolu üzerinde veya bu yol

üzerinden hareket eden çeşitli faktörler tarafından indüklenebilen (bu faktörler sitokinler, insülin ve CpG DNA (Tablo 2.5) olarak bilinmektedir), 16.kromozomun p13.13'ünde lokalize 23.4 kDa'lık bir proteindir. 3000'e yakın SNP (tek nukleotid polimorfizmi) içermektedir fakat bunlardan 17 tanesi klinik açıdan önem arz etmektedir. rs33989964 avrupa ve afrika popülasyonunda sık görülen bir polimorfizmdir. 16.kromozom üzerindeki TG delesyonunu (silinmesi) içerir. SOCS-1 dışında MBL2 (Mannoz bağlayıcı ligaz 2) içinde sık çalışılan bir polimorfizmdir (155,157). Kodlama dizisi iki ekzondan oluşur. Kodlama, genin promotöründen ikinci eksonun sonuna kadar uzanan büyük bir CpG adası ile karakterize edilen bir promotör bölgesi tarafından düzenlenir (158). Yapısı, korunmuş SOCS kutusunu ve SH2 alanını içerir, ancak ek olarak işlevi için kritik olan bir KIR alanına da sahiptir (Şekil 2.5). SH2 bölgesinin fonksiyon için önemi, mutasyon analizi yoluyla SOCS-1'de incelenmiştir, bununla birlikte hem SH2 alanının hem de SH2 alanına 24 amino asit N-terminalinin sitokin sinyalleme sinin baskılanması için gerekli olduğu anlaşılmıştır (156). SOCS-1 ekspresyonu, en başta IFN-g olmak üzere birçok sitokin (Tablo 2.5) tarafından indüklenir. Aşırı ekspresyon çalışmalarında, SOCS-1'in SH2 alanı aracılığıyla dört JAK kinazının tümü ile etkileşime girdiği ve bunların tirozin kinaz aktivitesini in vitro olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Hücre hatlarında SOCS-1 aşırı ekspresyonu, çoklu sitokinler tarafından STAT aktivasyonunu inhibe eder. SOCS-1'in T hücrelerinde spesifik aşırı ekspresyonu, bozulmuş T hücresi gelişimi ile sonuçlanır, bu da normal timosit oluşumunda SOCS-1'in bir rolü olduğunu düşündürmektedir (156). SOCS-1, JAK/STAT ve TLR/NF-KB yolları aracılığıyla makrofaj aktivasyonunu güçlü bir şekilde düzenler.TLR/NF-KB yolunu bastırmak için SOCS-1, NF-KB'nin p65 alt birimine bağlanır, böylece ubikuitin aracılı proteolizini kolaylaştırır. Bu etki şekli enflamatuvar süreçlerin, septik şokun ve doğuştan gelen/adaptif bağışıklık tepkilerinin düzenlenmesi için özellikle önemlidir (155).

Şekil 2-6: SOCS1, SOCS3 ve CIS tarafından JAK/STAT yolunun baskılanma mekanizması



(1) Hücre yüzeyi reseptörlerinin sitokin veya interferon ile uyarımı, fosforilasyonları (P) ile reseptörle ilişkili JAK proteinlerini aktive eder. Daha sonra aktive JAK'lar reseptör sitoplazmik domainlerini fosforile eder (2). Alınan STAT'ler sonuç olarak JAK fosforilasyonu ile aktive edilir (3). Bu fosforilasyon onların dimerizasyonunu sağlar (4). Dimerize olarak çekirdeğe girebilirler ve transkripsiyon faktörü kompleksi olarak SOCS genleri de dahil olmak üzere çeşitli hedef genlerin ekspresyonunu tetikleyebilirler (5). SOCS1, SOCS3 ve CIS gibi çeşitli SOCS proteinleri üretilir (6). SOCS1 ve SOCS3 sahip oldukları kinaz inhibitör bölgeleriyle JAK aktivitesini inhibe edebilirler (7). Ayrıca, SOCS3, paylaşılan fosfotirozin kalıntıları için toplanmış STAT proteinleri ile rekabet edebilir veya spesifik olarak, CIS, sitokin reseptörlerinin fosforlanmış tirozin kalıntılarını SH2 alanı yoluyla bağlayabilir ve sonuç olarak STAT5 yerleştirme bölgesini maskeleyebilir. Ayrıca, SOCS kutuları, bağlı reseptör bileşenlerinin yaygınlaşmasına ve bozulmasına aracılık eder (8). Bu eylemlerine bağlı olarak, transkripsiyon faktör kompleksleri artık çekirdeği oluşturamaz ve çekirdeğe erişemez (155).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta ve Kontrol Grubu

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kemik İliği Nakil Merkezinde yatan ‘Multiple Myeloma’ tanısı almış otolog kemik iliği transplantasyonu geçiren 18 yaşından büyük 120 birey gönüllü onam formları imzalatılıp onayları alınarak çalışmaya dahil edildi. Çalışma için İstanbul Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’ndan 22.05.2020 tarihli 2020/661 dosya numaralı etik kurul onayı alındı. Çalışmaya dahil edilen bireylerden alınan kan örnekleri analizler başlayana kadar İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’ndaki öğrenci araştırma laboratuvarlarında uygun sıcaklıkta (-20°C) saklandı.

Kontrol grubuna dahil edilen 18-80 yaş arası akut ya da kronik hastalık tanısı olmayan 80 birey çalışma hakkında bilgilendirilerek ve imzalı onamları alınarak bu çalışmaya dahil edildi. Kontrol grubunun katılımcılarından da kan örnekleri alınarak İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’ndaki öğrenci araştırma laboratuvarlarında -20°C’de saklandı. Örnek alımı sırasında gönüllü katılımcıların demografik verileri (cinsiyet, yaş) kaydedildi.

3.2. Gereçler

3.2.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- +4°C Buzdolabı (Altus, Vestel)
- -20°C Derin Dondurucu (Indesit)
- Plate Santrifüj (Nüve NF200)
- Mikrosantrifüj (Hermle Z233M-2)
- Makrosantrifüj (Hettich Rotanta 46)
- Mini santrifüj (Biosan MSC6000)
- İnkübatör (Nüve EN055)
- Vorteks (LMS VTX 3000L)
- Isı Bloğu (Euroclone)

- Thermal Cycler (PCR cihazı) (Applied Biosystems GeneAmp 9700 ve Benchmark TC 9639)
- Mic qPCR Cycler (qPCR cihazı) (Bio Molecular Systems)
- Spektrofotometre (Thermo Scientific NanoDrop 2000)
- Mikrodalga Fırın (Beko)
- Hassas Terazı (Sartorius CP2245)
- Yatay Jel Elektroforez tank ve güç kaynağı (Cleaver Scientific)
- UV-Transilluminator (Vilber Lourmat)
- Otomatik Pipetler (1-10 µl, 10-100 µl, 10-1000 µl) (Orange Scientific, Eppendorf)
- Çok kanallı otomatik Pipetler (20-200 µl, 1-10 µl) (Axygen)
- Soğuk Blok (Austin Dynamics)

3.2.2. Kullanılan sarf malzemeler ve kimyasallar

- 2ml mikrosantrifüj tüp (Capp)
- 1,5 ml mikrosantrifüj tüp (Capp)
- 0,2 ml PCR 8-strip tüp (NEST)
- 0,3 ml mic qPCR tüp (Bio Molecular Systems)
- 15 ml falkon tüp (Falcon)
- 50 ml falkon tüp (Falcon)
- 96 kuyulu plate (Applied Biosystems)
- Pipet uçları (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl) (Capp)
- Cam mezür (20 ml, 1000 ml)
- 4'lik EDTA'lı tüp
- 250 ml'lik cam erlen
- Pastör pipet

- Distile su (dH₂O)
- Dnaz/Rnaz Free Water (Zymotag)
- % 99 etil alkol (Emsure)
- EZ-96 DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research, Katalog no: D5006)
- Plus Blood Genomic DNA Purification Kit (GeneMark, Katalog no:DP023)
- Human Methylated & Non-methylated DNA Set- İnsan metile ve unmetile DNA seti (Zymo Research, Katalog no: D5014)
- ZymoTaq™ qPCR PreMix (Zymo Research, Katalog no: E2055)
- Agaroza (Bioline)
- Etidyum Bromid (Sigma Aldrich)
- Jel yükleme boyası (Thermo Fischer Scientific)
- DNA belirteç (100 bp Ladder) (Fermentas)
- Tris/Borat/EDTA (TBE) elektroforez tampon çözelti 50X stok (Thermo Fischer Scientific)
- dNTP (Invitrogen)
- Taq DNA polimeraz enzim-5 U/μl (Thermo Fischer Scientific)
- PCR tampon çözelti (MgCl₂ içeren) (GeneMark)
- RFLP Primer ve qPCR primerler (Primer) (Sentebiolab)
- Kesim enzimi (DdeI) ve tampon çözeltisi (NEB)

3.3. Yöntemler

Çalışmanın tüm laboratuvar test ve analizleri İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın öğrenci araştırma laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Hasta grubu ve kontrol grubuna ait bireylerden 4 ml'lik EDTA'lı tüplere alınan kanlar laboratuvar testleri başlayıncaya kadar -20°C derin dondurucuda saklandı. Toplanan her

kan örneğinden önce lökosit izolasyonu daha sonra elde edilen lökositlerden DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

3.3.1. Tam Kandan Lökosit İzolasyonu

Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

- +4°C’de bekletilmiş bdH₂O
- 15 ml’lik falkon tüp
- Otomatik pipetler ve pipet uçları (100 µl ve 1000 µl)
- 2 ml mikrosantrifüj tüp
- Steril pastör pipet
- Santrifüj cihazları
- Vorteks

Protokol

- -20°C’de saklanan kan örneklerinin oda sıcaklığına gelmesi beklenirken 15 ml’lik falkon tüplere ve 2 ml’lik mikrosantrifüj tüplere örneklerin isimleri, liste no’ları ve izolasyon tarihleri yazıldı.
- Her örnek kendi falkon tüpüne aktarıldı. Örnekleri içeren EDTA’lı tüpler 1000ml +4°C’de bekletilmiş bdH₂O ilavesi ile yıkandı ve falkonlara aktarıldıktan sonra üzerlerine 11 ml’ye kadar +4°C’de bekletilmiş bdH₂O ilavesi yapıldı.
- Falkon tüpler yaklaşık 1-2 dakika boyunca kuvvetlice elde çalkalandıktan sonra 5 dakika boyunca 3500 rpm’de santrifüj edildi.
- Santrifüjle iki faza ayrılan örneklerin üst kısımda kalan süpernatant sıvısı (yaklaşık 10 ml) steril pastör pipetlerle toplanıp atıldı.
- Falkon tüplerin dibinde kalan 1 ml’lik pelletin üzerine tekrar 13 ml’ye kadar +4°C’de bekletilmiş bdH₂O ilavesi yapılarak pellet dipten kalkana kadar elimizde hızlıca çalkalandı.
- Tüpler tekrar 3500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi.

- Santrifüjle üst kısımdaki süpernatant sıvı pastör pipetler yardımıyla dikkatlice toplanarak atıldı.
- Tüpte kalan pellet pipetle karıştırılıp 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.
- Falkon tüpleri son bir kez 650 µl bdH₂O ilavesi ile yıkandı ve 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.
- Tüpler vortekslenerek mikrosantrifüj cihazında 5500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Üstte kalan süpernatant sıvı pipetle pelleti kaldırmadan çekilerek atıldı.
- Kalan lökosit kısmı içeren tüpler kutulanarak DNA izolasyonu yapılana kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.3.2. DNA İzolasyonu

Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

- GeneDirex Blood Genomic DNA Isolation Kit içeriği;
 - Buffer CR
 - Buffer CC
 - Buffer CB
 - Buffer W1
 - Buffer W2
 - Buffer BE (Elution Buffer)
 - CC Kolon ve toplama tüpleri
- bdH₂O
- % 99 etil alkol
- 1,5 ml ve 2 ml mikrosantrifüj tüpleri
- Pipet ucu (10 µl, 100 µl ve 1000 µl)
- Isı Bloğu
- Mikrosantrifüj

- Vorteks
- Otomatik Pipet (10 µl, 100 µl ve 1000 µl)

Protokol

- Hücrelerin Elde Edilmesi
 - Daha önceden yapmış olduğumuz lökosit izolasyonu sonucunda her bir örnekten 200 µl alındı ve numaraları yazılı olan 2 ml'lik tüplere aktarıldı.
 - Üzerine 900 µl Buffer CR solüsyonu eklendi ve elde iyice çalkalandı.
 - 10 dakika boyunca oda ısısında inkübasyona bırakıldı ve bu sırada tüpler 2 kere daha elde çalkalandı.
 - İnkübasyon işlemi sonunda tüpler 4,000 g'de 5 dakika santrifüj edildi.
 - Süpernatant uzaklaştırıldı ve 50 µl Buffer CR solüsyonu ile pellete pipetaj yapıldı.
- Hücrelerin Parçalanması
 - Tüplere 300 µl Buffer CC solüsyonu eklendi ve vortex yapıldı.
 - 60°C'de 10 dakika ısı bloğunda inkübasyon yapıldı.
 - İnkübasyondan sonra tüpler tekrar vortexlendi.

NOT: Bu aşamadan sonra Buffer BE elüsyon işlemine kadar 60°C'de inkübasyona bırakıldı.

- Proteinin Uzaklaştırılması
 - Tüplere 400 µl Buffer CB solüsyonu eklendi ve tüpler yatay olarak çalkalandı.
 - 12,000 g 'de 1 dakika santrifüj edildi.
- DNA'nın Bağlanması
 - 2 ml'lik toplama tüpleri içine CC kolonları yerleştirildi ve tüpler numaralandırıldı.
 - Tüplerdeki tüm ürünler CC kolonlarına aktarıldı.
 - 14,000 g'de 1 dakika santifüj edildi.

- 2m'lik toplama tüpünde biriken sıvı uzaklaştırıldı.
- Yıkama
 - 400 µl Buffer W1 CC kolonuna aktarıldı.
 - Kolonlar 14,000 g'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra alta biriken sıvı uzaklaştırıldı.
 - Etanol eklenerek hazırlanan Buffer W2 solüsyonundan 600 µl CC kolonlarına aktarıldı.
 - Kolonlar 14,000 g'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra alta biriken sıvı uzaklaştırıldı.
 - Kolonlar 14,000 g'de 2 dakika boş olarak santrifüj edildi.
- DNA'nın Elde Edilmesi
 - CC kolonları 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi.
 - 100 µl önceden ısıtılmış Buffer BE solüsyonu CC kolonlarının içindeki filtrelerin tam ortasına aktarıldı.
 - Tüpler 60°C'de 3 dakika boyunca ısı bloğunda bekletildi.
 - 14,000 g'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra CC kolonlar atıldı ve DNA toplanmış tüplerin kapakları kapatılarak -20°C'de saklandı.

3.3.3. DNA Saflık ve Konsantrasyon Ölçümleri

- İzole edilmiş DNA'ların saflık ve konsantrasyon ölçümleri spektrofotometre cihazında gerçekleştirildi.
- Konsantrasyonları 30 ng/ µl ve üzeri olan örnekler çalışma için uygun görüldü. 30 ng/ µl 'den az olan DNA örnekleri için tekrar lökositten DNA izolasyonu işlemi gerçekleştirildi.
- DNA örneklerinin saflıkları OD 260/280 nm dalga boyunda 1,8 ile 2,0 arasında ölçüldü.
- Ölçümleri yapıp not edilen DNA örnekleri -20°C'de muhafaza edildi.

3.3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR, herhangi bir organizmaya ait özgül DNA'daki istenen bölgelerin çoğaltılmasını sağlayan yönteme verilen addır. PCR reaksiyonu, in vitro koşullarda belirli DNA/RNA parçasının enzimatik olarak milyonlarca kopyalanmasını ve çoğaltılmasını sağlar. İlk olarak ABD kökenli Cetus şirketinde çalışan Henry A. Erlich, Kary B. Mullis ve Randall K. Saiki tarafından 1985 yılında bilim dünyasına sunulmuştur ve bu buluşundan dolayı Mullis, 1993 yılı Nobel Kimya Ödülü'nü Michael Smith ile paylaşmıştır.

PCR reaksiyonun gerçekleşmesi için öncelikle kalıp bir DNA gereklidir. Çoğaltılmak istenen bölge için spesifik dizayn edilmiş primerler, uzayacak bölgeye eklenecek serbest nükleotidler, enzimin çalışacağı uygun koşulları sağlayan bir tampon çözelti ve ısıya dayanıklı DNA polimeraz (Taq polimeraz) enzimine ihtiyaç bulunmaktadır. PCR metodu temelde 3 farklı aşamadan oluşur ve DNA'nın hücre içinde kendini eşlemesi mekanizmasına dayanır (Şekil 3.1).

1.İlk Denatürasyon Aşaması: Bu aşamada çift iplikli DNA molekülü yüksek sıcaklık ile (94-96°C) ile 5-20 dakika arası bir zamanda tek zincirli duruma getirilir.

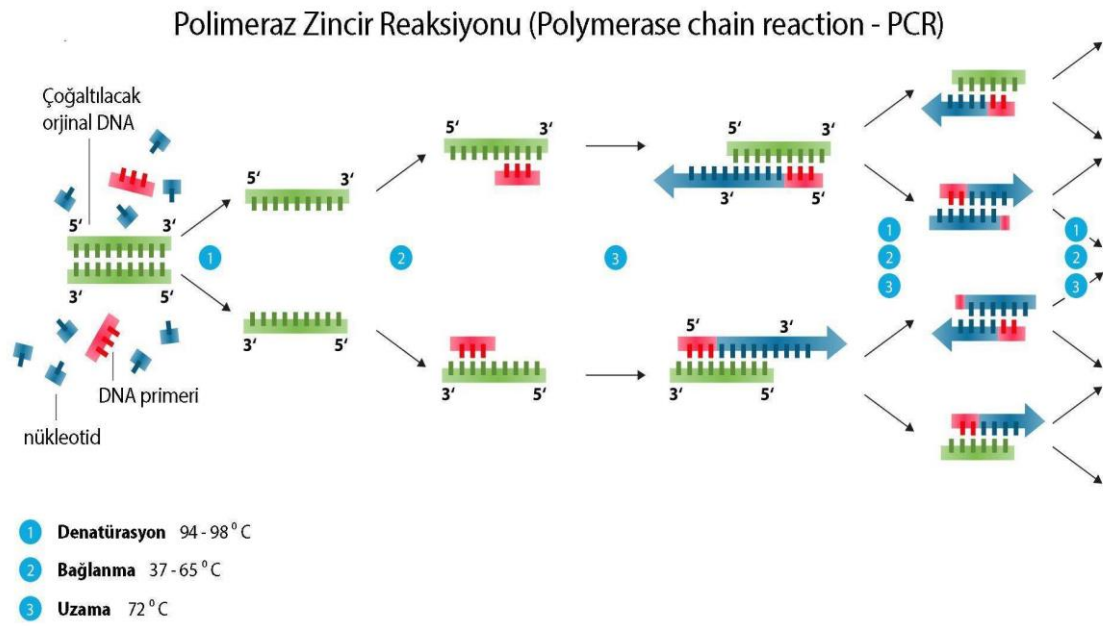
2.Çoğalma (Amplifikasyon): Bu aşama DNA bölgesinin uzunluğuna ve hedeflenmiş DNA kopya sayısına göre 25-45 döngü arasında tekrarlanabilir. Amplifikasyon aşaması da 3 bölümden oluşur.

- **Denatürasyon:** Hedef bölgenin “G+C” oranına göre 94-96°C arasında değişen bir sıcaklığa ayarlanır.
- **Bağlanma:** Primerlerin sentezlenme özelliklerine ve nükleotid dizilerine göre 45-70°C arasında bir sıcaklıkta olabilir. Bu aşamada primerler tek iplikli DNA'ya bağlanır.
- **Uzama:** DNA polimeraz enziminin aktivitesinin maksimum olması için sıcaklık 72°C'ye ayarlanır. DNA polimeraz enzimi ile dNTP'lerin varlığında hedef bölge boyunca uzatılmış olur.

Bu aşamadaki her döngünün sonunda başlangıçtaki hedef DNA materyali 2 katına çıkmış olur.

3.Sonlanma (Son uzama): 72°C’de amplikon uzunluğuna göre 5-10 dakika arasındaki çoğalma döngülerinden sonraki aşamadır. Yeni sentezlenmiş ipliklerin uçlarının dNTP’lerle son kez eksikleri tamamlama işlemidir.

Şekil 3-1: Polimeraz zincir reaksiyonu aşamaları (159)



3.3.4.1. PCR tekniğinde kullanılan cihazlar ve malzemeler

- PCR Cihazı (Thermal Cycler)
- Otomatik pipetler (10 µl, 100 µl ve 1000 µl)
- Çok kanallı otomatik pipetler (1-10 µl ve 20-200 µl)
- Pipet uçları
- Vortex
- 1,5 ml mikrosantrifüj tüpleri
- 0,2 ml mikrosantrifüj tüpleri
- bdH₂O

- Taq DNA polimeraz
- dNTP
- PCR tampon çözelti (MgCl₂ içeren)
- Primer

3.3.4.2. Primer hazırlığı

Liyofilize şekilde temin edilmiş primer dizayn edildiği prosedüre uygun şekilde bdH₂O ile çözdürüldü. Elde edilen 100 pmol/μl'lik stok primer 1:10 oranına göre bdH₂O ile sulandırılarak 10 pmol/μl'lik bir çözelti şeklinde uygulanacak PCR metodu için hazır hale getirildi. Çalışmada kullanılan primer dizisi ve bağlanma sıcaklığı Tablo 3.1'de gösterilmiştir (160).

Tablo 3-1: Çalışılan gen bölgesini primer dizileri ve koşulları

Çalışılan Bölge	Yöntem	Primer Dizisi	Bağlanma Sıcaklığı/ Döngü sayısı	Kaynak
SOCS1-1478CA/del	PCR-RFLP	F:5'-TGTCGTCCAGCTGCACCTC-3' R:5'-ACCACAGGCTTCAGAGGAAC-3'	60°C / 30 döngü	160

3.3.4.3. PCR içeriğinin hazırlanması ve PCR koşulları

SOCS1-1478CA/del bölgesi için hazırlanan PCR içeriği Tablo 3.2'de PCR programı ise Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3-2: SOCS1-1478CA/del bölgesi için hazırlanan PCR içeriği

Reaktifler	Hacim
bdH ₂ O	15,2 μl
PCR tampon çözeltisi (MgCl ₂ içeren)	2,5 μl
dNTP	2 μl

F primer	1 µl
R primer	1 µl
Taq DNA polimeraz	0,3 µl
DNA	3 µl
Toplam	25 µl

Tablo 3-3: SOCS1-1478CA/del bölgesi için PCR koşulları

Sıcaklık Değeri	Bekleme Süresi	Döngü Sayısı
95°C	5 dakika	1 döngü
95°C	1 dakika	
60°C	1 dakika	30 döngü
72°C	1 dakika	
72°C	7 dakika	1 döngü
4°C	∞	

3.3.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

DNA’da oluşan mutasyon ve polimorfizm çalışmalarında sıkça kullanılan restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (Restriction fragment length polymorphism = RFLP) metodu restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucunda oluşan farklı boylardaki DNA segmentlerini belirlemeyi sağlar. Kesim enzimleri DNA üzerindeki spesifik dizileri tanır ve o dizilere bağlanarak DNA’yı o bölgeden keserler. Oluşan farklı baz uzunluğundaki DNA parçaları jel elektroforezinde büyüklüklerine göre ayrılırlar. Bu çalışmada SOCS1-1478CA/del fonksiyonel varyantı PCR-RFLP tekniğiyle analiz edilmiştir.

3.3.5.1. Enzim Kesimi

Kullanılan cihazlar ve malzemeler

- İnkübatör
- Vortex
- Otomatik pipetler (10 µl ve 100 µl)
- Çok kanallı otomatik pipetler (1-10 µl ve 20-200 µl)
- Pipet uçları
- 1,5 ml mikrosantrifüj tüp
- Soğuk blok

Enzim Kesimi Koşulları

SOCS1-1478CA/del bölgesi için hazırlanan enzim kesimi içeriği Tablo 3.4'te kullanılan enzimin inkübasyon ve kesim bölgesi bilgileri ise Tablo 3.5'te verilmiştir.

Tablo 3-4: SOCS1-1478CA/del bölgesi için DdeI enzim kesimi içeriği

Reaktifler	Hacim
bdH2O	3,55 µl
10X kesim tampon çözeltisi	1,2 µl
Restriksiyon enzimi	0,25 µl
PCR ürünü	7 µl
Toplam	12 µl

Tablo 3-5: Çalışılan bölgenin analizinde kullanılan kesim enzimi

Çalışılan Bölge	Kesim Enzimi	İnkübasyon Sıcaklığı/ Süresi	Kesim Bölgesi
SOCS1-1478CA/del	DdeI	37 °C / 1 gece	5'...C↓TNAG...3' 3'...GANT↑C...5'

3.3.6. Kantitatif Metilasyon Spesifik PCR (qMSP)

Kantitatif MSP (qMSP), metillenmiş alleli çok daha fazla sayıdaki metillenmemiş allelden kantitatif biçimde tespit edebildiği için metilasyon analizi çalışmalarında uygun bir yöntemi temsil eder. İlk qMSP testi olan MethyLight, MSP'yi yalnızca metillenmiş veya metillenmemiş belirli bir diziyeye bağlanan bir TaqMan probu ile sağlamaktadır (161). Bu teknik, floresan etiketli problara ihtiyaç duymaktadır. SYBR Green tabanlı qMSP ise problara duyulan ihtiyacı ortadan kaldırır ve böylece testin toplam maliyetini azaltan bir yöntemdir. SYBR Green boya bazlı qMSP, PCR reaksiyonundan sonra amplifiye edilen ürünün özgünlüğünü doğrulamak için erime eğrisi analizine izin verir. Aslında, erime sıcaklığının (T_m) yazılım hesaplaması, amplifiye ürünü primer dimerlerden ayırır, bu da SYBR Green ile floresan sinyaliyle sonuçlanır, ancak genellikle ampikon ürününden daha kısa olan daha düşük bir sıcaklıkta erir. Bir DNA molekülünün T_m 'si sadece boyutuna değil aynı zamanda nükleotid bileşimine de bağlıdır. Bu nedenle, başlangıçta metillenmiş bir DNA dizisinden elde edilen PCR ürünleri, metillenmemiş şablonlardan türetilenlerden daha yüksek bir T_m 'ye sahip olmalıdır. Buna göre, bölümün metodolojik kısmı özellikle SYBR Green boya bazlı qMSP tahlilleri ile metilasyonunun nicel ölçümüne odaklanmaktadır (162). Bu çalışmada avantajlarından dolayı SYBR Green boya bazlı qMSP yöntemi kullanıldı.

3.3.6.1. DNA Bisülfite Dönüşümü

DNA'nın metilasyon statüsünü belirlemek için sodyum bisülfite modifikasyonu altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemle DNA'daki metillenmemiş tüm sitozinler kimyasal reaksiyonla Urasil'e çevrilir. DNA'daki metillenmiş olan sitozinler ise reaksiyon süresince değişmeden kalır (163).

Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

- Vortex
- Mikrosantrifüj
- Otomatik Pipetler (10 µl, 100 µl ve 1000 µl)
- PCR Cihazı
- Human Methylated & Non-methylated DNA Set- İnsan metile ve unmetile DNA seti (Zymo Research Katalog no: D5014)
- % 99 etil alkol
- bdH₂O
- 1,5 ml Mikrosantrifüj tüp
- 0,2 ml Mikrosantrifüj tüp
- EZ-DNA Methylation-Gold™ Kit içeriği;
 - CT Conversion Reagent
 - M-Dilution Buffer
 - M-Dissolving Buffer
 - M-Binding Buffer
 - M-Wash Buffer
 - M-Desulphoration Buffer
 - M- Elution Buffer
 - Zymo-spin IC Coloumn
 - Collection Tube

Protokol

- **CT Conversion Reagent Hazırlanması**
 - Toz halde CT conversion buffer bulunan tüpe 900 µl bdH₂O, 300 µl M-dilution buffer ve 50 µl M-dissolving buffer eklendi.
 - Oda sıcaklığında 10 dakika sık sık vortex yaparak homojen bir karışım elde edildi.

- **M-Wash Buffer Hazırlanması**

- Kullanılmadan önce 24ml %100'lük ethanol, 6ml M-Wash buffer ile yoğunlaştırıldı.
- Tüm DNA örneklerinin konsantrasyonları 200 ng/ µl olacak miktarda ayarlandı.
- 0,2 ml mikrosantrifüj tüpüne 130 µl CT conversion reagent ve 20 µl DNA örneği eklendi.
- Hasta ve kontrol örnekleri dışında insan metile DNA örneği ve insan unmetile DNA örneklerinden 1'er µl 130 µl CT conversion reagent ile 0,2 ml mikrosantrifüj tüpünde karıştırıldı.
- DNA örneğinin hacmi 20 µl'den az olanlarda fark bdH₂O ile tamamlandı. Pipetleyerek örnekler karıştırıldı.
- Örnek Tüpleri PCR cihazına konuldu. PCR cihazında uygulanan adımlar Tablo 3-6'da gösterilmiştir.

Tablo 3-6: DNA Bisülfid dönüşümü PCR koşulları

Sıcaklık Değeri	Bekleme Süresi	Döngü Sayısı
98°C	10 dakika	1 döngü
64°C	150 dakika	1 döngü
4°C	∞	

- 600 µl M-binding buffer zymo-spin IC column'a eklendi ve kolon collection tube'e yerleştirildi.
- PCR ürünü M-binding buffer içeren zymo-spin IC coloumn'a aktarıldı. Kapak kapatıldı ve kolon birkaç kez ters çevirerek karıştırıldı.
- Tüpler 2 dakika 14,000 rpm de santrifüj edildi ve collection tubede toplanan sıvı atıldı.
- 100 µl M-Wash buffer kolona eklendi. Tüpler 2 dakika 14,000 rpm de santrifüj edildi ve collection tubede toplanan sıvı atıldı.

- 200 µl M-desulphoration buffer kolona eklendi ve kolonlar oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. İnkübasyondan sonra tüpler 2 dakika 14,000 rpm de santrifüj edildi ve collection tubede toplanan sıvı atıldı.
- 200 µl M-Wash buffer kolona eklendi. Tüpler 2 dakika 14,000 rpm de santrifüj edildi ve collection tubede toplanan sıvı atıldı. Bu aşama bir kez daha tekrar edildi.
- Kolon 1,5ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alındı. 10 µl M-elution buffer kolonun tam ortasına eklendi. Elution tüpler 2 dakika 14,000 rpm de santrifüj edildi ve kolonlar atıldı.
- Bu bisülfite dönüşümü işlemi 120 hasta grubu ve 80 kontrol grubu olmak üzere toplamda 200 DNA örneğine uygulandı.
- DNA bisülfite dönüşümü yapılmış örneklerin konsantrasyonları ölçüldü. Konsantrasyonların 30 ng/ µl ile 60 ng/ µl arasında olduğu görüldü.
- DNA bisülfite dönüşümü yapılmış her bir örneğin bulunduğu tüpler kutulandı ve ileri testler yapılana kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.3.6.2. qMSP metodu Primer hazırlığı

SOCS-1 ve ACTB genlerinin metilasyon analizinde HPLC metodu ile sentezlenen 1'er çift metile primer dizisi kullanıldı. Liyofilize halde bulunan primerler, dizayn prosedürlerine göre ddH₂O ile çözdürüldü. Elde edilen 100 pmol/µl'lik stok primerler de 1:10 oranına göre ddH₂O ile sulandırıldı. Çalışmada kullanılan primer dizileri ve bağlanma sıcaklıkları Tablo 3.7'de gösterilmiştir (164,165).

Tablo 3-7: Çalışmada kullanılan primer dizileri ve bağlanma sıcaklıkları

Çalışılan Bölge	Forward (5'-3')	Reverse (3'-5')	Bağlanma Sıcaklığı/ Döngü Sayısı
SOCS-1	TTCGCGTGTATT TTTAGGTCGGTC	CGACACAACCTCC TACAACGACCG	64°C /35
ACTB (B-actin)	TGGTGATGGAGG AGGTTTAGTAAGT	AACCAATAAAACC TACTCCTCCCTTAA	60°C /35

Kullanılan Cihazlar ve malzemeler

- Mic qPCR cihazı
- Vorteks
- Otomatik Pipetler (10 µl, 100 µl ve 1000 µl)
- ZymoTaq™ qPCR PreMİx
 - qPCR premix
 - bdH2O
- 1,5 ml mikrosantrifüj tüp
- 48'lik qPCR plate

3.3.6.3. qMSP metodu için gerekli qPCR içeriği ve qPCR koşulları

Her bir örnek iki gen bölgesine ait HPLC primerlerle hazırlanan uygun PCR koşullarında çoğaltılarak çalışılmıştır. qMSP metodu içeriği Tablo 3.8'de ve bölgelere göre qPCR koşulları Tablo 3.9'da verilmiştir.

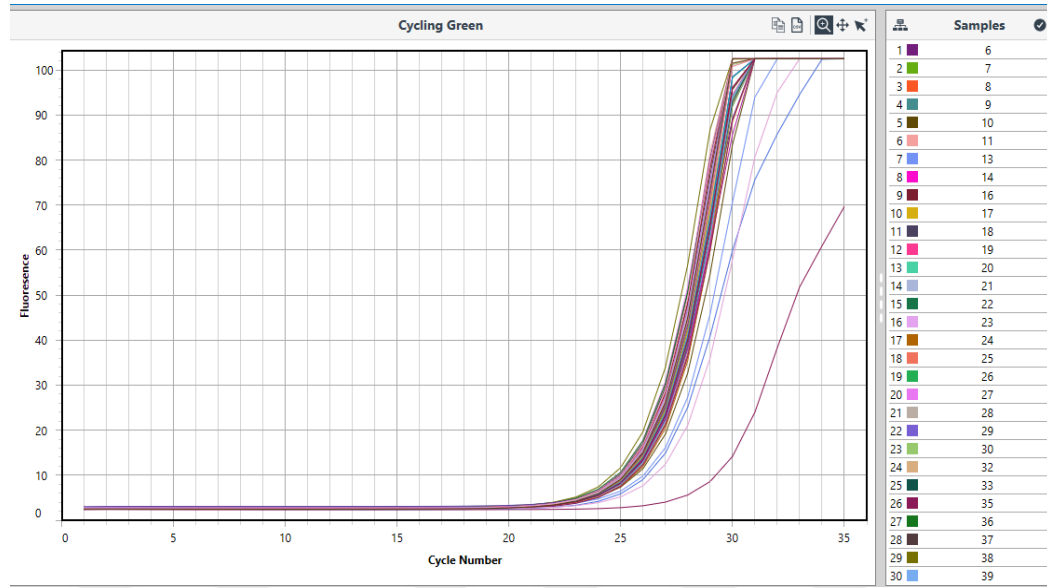
3.3.6.4. qMSP metodunda sonuç hesaplanması

Bu çalışmada hedef gendeki metilasyon yüzdesini belirleyebilmek için literatürde sıkça yer verilen ACTB (B-aktin) iç kontrol geni kullanıldı. qPCR sonucunda elde edilen Cq değerlerinden yüzde metilasyon (PMR) hesabı için aşağıda belirtilen formül kullanıldı (165).

$$\Delta\Delta Ct = \text{Örnek DNA (Ct hedef gen - Ct ACTB gen)} - \%100 \text{ metile DNA (Ct hedef gen - Ct ACTB gen)}$$

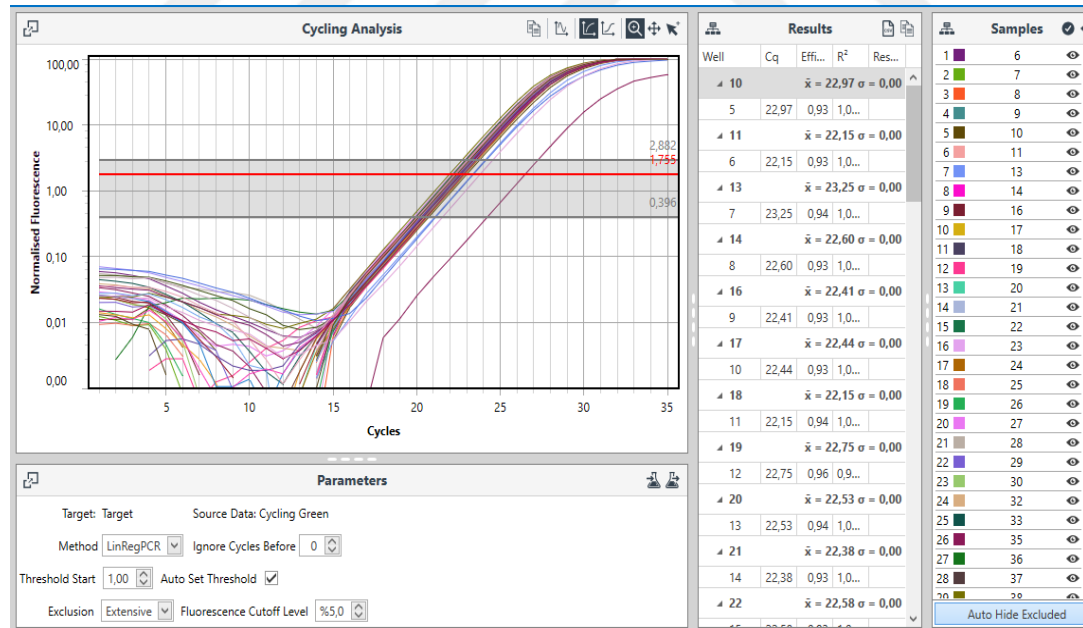
$$\text{PMR: } 2^{\Delta\Delta Ct} \times 100$$

Şekil 3-2:qMSP sonuç grafiği



Çalışılan örneklerin belirlenen eşik değeri aştığını gösteren grafik.

Şekil 3-3: Ct/Cq değerlerini içeren grafik



Her örneğin belirlenen eşik değeri kaçınıcı döngüde (Ct).

Tablo 3-8: qMSP metodu PCR içeriği

Reaktifler	Hacim
2X qPCR Premix	10µl
Forward Primer	1µl
Reverse Primer	1 µl
bdH2O	6,5 µl
Bisüfitlenmiş DNA miktarı	1,5 µl
Toplam	20 µl

Tablo 3-9: qMSP metodu PCR koşulları

Sıcaklık Değeri	Bekleme Süresi	Döngü Sayısı
95°C	10 dakika	1 döngü
95°C	30 saniye	
Primere göre	30 saniye	35 döngü
72°C	40 saniye	
72°C	7 dakika	1 döngü
4°C	∞	

3.3.7. Agaroz Jel Elektroforezi

Kullanılan cihazlar ve malzemeler

- Mikrodalga fırın
- Yatay jel elektroforez sistemi
- Jel görüntüleme sistemi

- Hassas Terazî
- Otomatik pipetler (10 µl, 100 µl ve 1000 µl)
- 250 ml Erlen
- Agaroz
- Etidyum Bromid
- Jel yükleme boyası
- DNA belirteç (100 bç Ladder)
- TBE tampon çözelti

3.3.7.1. TBE Tampon çözelti Hazırlanması

50X stok TBE tampon çözeltisi 1/50 oranında bdH₂O ile seyreltilerek 1X TBE tampon çözelti olarak elektroforezde ve agaroz jel hazırlamada kullanılmak üzere hazırlandı.

3.3.7.2. Agaroz Jel Hazırlanması

- SOCS-1 (-1478) gen bölgesinin PCR ürün kontrolü ve analizi yapılacak ürünler için hazırlanan agaroz protokolü;
 - RFLP metodu uygulanacak PCR ürünlerinin kontrol edilmesi amacıyla 3 gram agaroz tartılarak 120 ml 1X TBE buffer ile hazırlanmış %2,5'luk agaroz jel,
 - Enzim kesimi yapılmış PCR ürünlerinin analizi için 3,6 gram agaroz tartılarak 120 ml 1X TBE buffer ile hazırlanmış %3,5'luk agaroz jel,
- 600C'ye kadar soğutulmuş olan homojen agaroz jel çözeltisinin içerisine içine 5 µl EtBr eklenerek karıştırıldı.
- Yükleme yapılacak kuyuları belirleyen taraklar yerleştirilmiş olan elektroforez tabağına hazırlanan çözelti döküldü. Jel soğuyup donduktan sonra taraklar dikkatlice çıkarıldı ve 1X TBE tampon çözeltisinin olduğu elektroforez tankına yerleştirildi.

3.3.7.3. Örneklerin jele yüklenmesi ve yürütülmesi

- Analiz edilecek her üründen 10 µl ve yükleme boyasından ise 5 µl pipetajla karıştırılarak kuyulara yüklendi.

- Görüntülenecek bantların boyutlarının belirlenebilmesi için 50 bç-1000 bç aralığında DNA belirteci ilk kuyulara yüklendi.
- RFLP metoduyla kesim yapılmış örneklerin yüklenmesinde kesilmemiş PCR ürünü de yüklenerek karşılaştırma yapıldı.
- Ürünlerin kontrol ve analizleri yapılırken farklı voltaj ve sürelerle yürütme işlemi gerçekleştirildi.
 - RFLP metodu uygulanacak PCR ürünleri 120 voltta 30 dakika,
 - Enzim kesimi yapılmış ürünler 110 voltta 45 dakika sürelerle elektroforezde yürütüldü.
- Yürütme işlemlerinden sonra jeller UV ışık altında jel görüntüleme sisteminde görüntülendi ve fotoğraflandı.

3.3.7.4. Enzim kesim sonuçlarının belirlenmesi

Enzim kesimi yapılmış gen bölgesinin allelleri Tablo 3.10'daki bç uzunluklarına göre belirlenmiştir

Tablo 3-10: Çalışılan bölgeye ait allel bantlarının uzunlukları

Gen ve polimorfizm	Allel bant uzunlukları (bç)	Kaynak
SOCS-1 (-1478CA/Del)	CA: 105, 145	160
	Del: 250	

3.4. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada tüm verilerin istatistiksel analizi için SPSS 21 paket programı kullanıldı. Hasta ve kontrol grupları arasındaki farklılıkların istatistiksel önemi lojistik regresyon analizi ile tahmin edildi. Exp Odds oranları (OR'ler) cinsiyet ve yaş için kontrol edilen bir lojistik regresyon modeli ile hesaplandı ve %95 güven aralığında rapor edildi. Kontrol ve hasta grupları arasında SOCS-1 allel ve genotip frekansları arasındaki farklılıklar χ^2 testi kullanılarak karşılaştırıldı ve gerektiğinde Fisher's kesin testi kullanıldı. Hardy-Weinberg denklemi, tahmini genotip frekanslarını ve gözlenen genotip frekanslarını

hesaplamak için kullanıldı. Hayatta kalma olasılıkları Kaplan-Meier yöntemiyle tahmin edildi ve farklılıklar log rank testi kullanılarak karşılaştırıldı. Risk faktörlerinin önemini doğrulamak için Cox aşamalı regresyon analizi kullanıldı. Çok değişkenli analizde, %10'dan daha az anlamlılık ile adım adım (geriye doğru) elimine edilen değişkenleri kullanıldı. $p < 0,05$ değeri istatistiksel anlamlılığı belirtmek için kabul edildi. Riskli grubu belirlemede etkili olabileceği klinik olarak düşünülen değişken için Receiver Operating Characteristic (ROC) analizi yapıldı ve ROC grafikleri çizildi, eğri altında kalan alan (AUC) ve bu alanının %95 güven aralıkları belirlendi. Tanı sonuçlarının karşılaştırılması ve değerlendirilmesi amacıyla Youden indeksi hesaplandı ve uygun kesim noktası belirlendi.



4. BULGULAR

4.1. Klinik Veriler

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kemik İliği Nakil Merkezinde yatan ‘Multiple Myeloma’ tanısı almış otolog kemik iliği transplantasyonu geçiren 18 yaşından büyük 120 birey ve 80 sağlıklı kontrol çalışmamıza dahil edildi. Çalışmamıza dahil edilen 120 hastanın 56'sı (%47) kadın, 64'ü (%53) erkekti. Hastaların ortalama yaşı 55 idi. Kontrol ve hasta grubu arasında cinsiyet dağılımı açısından anlamlı fark bulunmadı ($p=0,064$). 5 yıllık PFS (progresyonsuz sağ kalım) %52 ve 5 yıllık OS (genel sağ kalım) %80,5 ile sonuçlandı. Mortalite takip sırasında 18 hasta ile %15 iken, medyan takip süresi 38,3 ay (dağılım: 4,1-105,3 ay) idi (Tablo 4.1).

Tablo 4-1: Otolog kemik iliği transplantasyonu (APSCT) olan MM hastaları ve sağlıklı kontrol grubuna ait klinik veriler, tedavi rejimleri

		Multiple Myeloma		Kontrol	Kontrol	p	
		medyan	n ^a	(%)	medyan	n ^b	(%)
Yaş		55			45		0.001*
Cinsiyet	Kadın/Erkek		56/64	(47/53)		42/38	0.064&
						(52,5/47,5)	
Ig subtipleri	κ/λ		62/34	(65/35)			
	G/A		63/13				
			(63.6/13.2)				
	Hafif zincir		20	(20.2)			
Evre (Salmon-Durie)	II/III		29/69				
			(37.9/62.1)				
	A/B		74/24				
			(75.5/24.5)				
IPI	I		31	(32)			
	II/III		25/41				
			(25.8/41.3)				
ECOG	>1		7	(7.2)			
Hemoglobin	gr/dL	10.3 (6.2-15)					
Lökosit	µL	6900 (2760-18500)					
Trombosit	10 ³ /µL	183 (103-406)					
C-reaktive protein	mg/dL	7.2 (2.1-352)					
LDH	IU/L	203 (93-1037)					
b2-mikroglobulin	mg/L	5 (1.5-47.4)					
Albumin	gr/L	3.5 (1.6-5.1)					
Tedavi	VCD, APBSCT, LD						
OS (5-yıl, %)		(80)					
PFS (5-yıl, %)		(52)					
Relaps			44	(36.7)			

Mortalite	18	(15)
Ortalama takip (ay)	38.3 (4.1-105.3)	

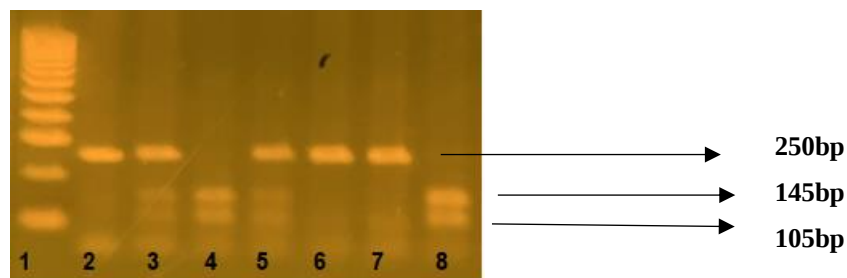
n^a = 120; n^b = 80; *median test, *Pearson Chi-Square, VCD, bortezomib, cyclophosphamide, dexamethasone, LD, lenolidomid, dexamethasone; APSCT, ; PFS: Progresyonsuz sağ kalım, OS: Genel sağ kalım.

4.2. SOCS-1 Geni -1478CA>Del Varyantına ve PMR (yüzde metilasyon değeri)'ye Ait Veriler

SOCS-1 Geni -1478CA>Del bölgesinin PCR ürününe ve DdeI kesim enzimi uygulanan kesim ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü Şekil 4.1'de yer almaktadır.

MM'li hastalar ve sağlıklı kontroller arasında SOCS-1 (-1478CA>Del) genotip dağılımı açısından istatistiksel analizde; Del/Del genotipi (p=0,034) ve Del alleli (p=0,001). MM'li hastalarda anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Hasta ve kontroller arasındaki metilasyon farkını belirleyebilmek için bir internal kontrol olan ACTB(B-actin) ve % 100 metile DNA kullanıldı. İlk önce %100 metile DNA'nın hem SOCS-1 hem de ACTB için qpcr ile Ct değeri hesaplandı ve bu değer referans olarak alındı. Daha sonra her bir örneğin hem SOCS-1 hem de ACTB primerleri için Ct değeri hesaplandı. Örnekler için hesaplanan Ct değerleri ile %100 metile DNA için hesaplanan Ct değerleri arasındaki farka göre PMR hesabı yapıldı. Buna göre SOCS-1 geninin PMR'si (yüzde metilasyon değeri) sağlıklı kontrollerde anlamlı olarak daha yüksek bulundu (medyan: 43,48, aralık: 2,76-247,75; p=0,001) (Tablo 4.2).

Şekil 4-1: 1478CA>Del bölgesi PCR ve kesim ürünleri



1:Belirteç, 2: PCR ürünü, 3,5: CA/Del (250,145,105bp), 4,8: CA/CA (145,105bp), 6,7: Del/Del (250bp)

Tablo 4-2: SOCS-1 Geni -1478CA>Del varyantı genotip, allel dağılımı ve yüzde metilasyon değeri (PMR)

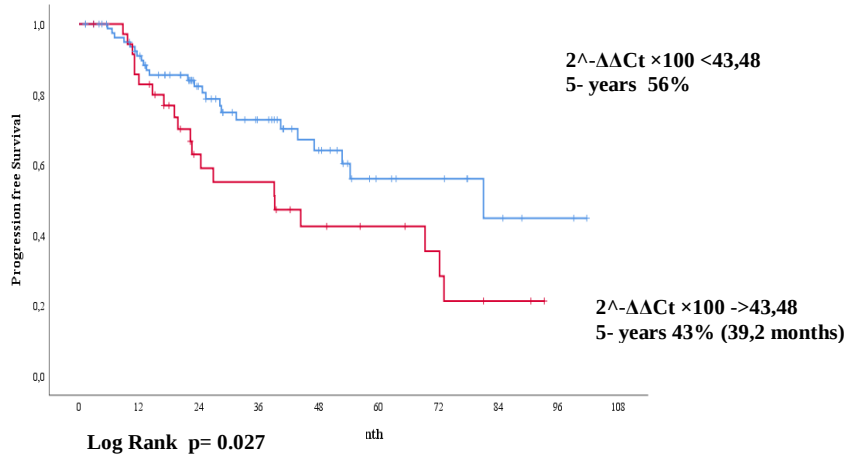
SOCS-1	Genotip	Multiple Myeloma	Sağlıklı Kontrol	OR Exp(B)	95% CI	p
		n= ^a (%)	n=80 (%)			
SOCS-1	CA/CA	20 (16,7)	30 (37,5)	0,243*	0,106-0,558*	0,001*
	CA/Del	49 (40,8)	29 (36,3)	0,620*	0,294-1,309*	0,210*
	Del/Del	51 (42,5)	21 (26,2)	0,498 ^{&}	0,269-0,923 ^{&}	0,034^{&}
Allel						
	CA	89 (37,1)	89 (55,6)			
	Del	151 (62,9)	71 (44,4)	2,127 ^{&}	1,415-3,196 ^{&}	0,001^{&}
2⁻ΔΔCt	×100 (PMR)	20.11 (2.11-717.30)	43.48 (2.76-247.75)			0.001[#]

^an= 120, *:OR (95%CI) yaşa ve cinsiyete göre ayarlandı, [&]Fisher kesin Testi, [#]medyan test

4.3. MM'li hastaların prognostik faktörleri ile progresyonsuz sağkalım (PFS) ve OS Genel sağ kalım (OS)'nin karşılaştırılması

PFS ve OS'yi etkileyen faktörlerin istatistiksel analizinde, SOCS-1 genotip dağılımının PFS ve OS üzerinde hiçbir etkisi olmadığı görülmüştür (PFS için, p=0,229; OS için, p=0,763). Hastalar CA/CA, CA/Del, Del/Del genotipleri olarak ayrı ayrı gruplandırıldığında da progresyonsuz sağ kalım ve genel sağkalım açısından anlamlı bir etki saptanmadı (PFS için, p=0,140; OS için, p=0,462). Buna karşın yüzde metilasyon açısından sağlıklı kontrollerin 43,48 ortanca PMR değerine göre yapılan istatistiksel analizde, PMR değeri <43,48 olan hastaların anlamlı olarak daha uzun PFS gösterdikleri görülmüştür. Bu durum literatürde bir iltir (<43,48 için %56, ≥ için 43,48 %43; p=0,027) (Tablo 4.3, Şekil 4.2). Bunun yanı sıra genel sağkalım açısından her iki grup arasındasinda anlamlı fark bulunmamıştır (p=0,484) (Tablo 4.3).

Şekil 4-2: Metilasyon durumu açısından hasta alt grupları arasında progresyonsuz sağkalım (PFS) analizi



Tablo 4-3: MM'li hastaların prognostik faktörleri ile PFS ve OS'nin karşılaştırılması

		N	PFS Medyan,ay * (5-yıl %)	Log Rank p- değeri	OS Medyan,ay * (5-yıl %)	Log Rank p- değeri
		120	(52)		(80)	
SOCS-1	CA/CA	20	43,8		(81)	
	CA/Del	49	(63)		(80)	
	Del/Del	51	(52)	0,229	(78)	0,763
SOCS-1	CA/CA	20	43,8		(81)	
	CA/Del-Del/Del	100	(57)	0,140	(79)	0,462
2 ^{ΔΔCt} ×100 (PMR)	<43,48	84	(56)		(82)	
	>43,48	36	39,2	0,027	(77)	0,484

PFS: Progresyonsuz sağkalım, **OS:** Genel sağkalım, **PMR:** Metillenmiş referans yüzdesi

4.4. ROC analizi ile PMR değişkenleri açısından hasta ve kontrol grubunun karşılaştırılması

Metilasyon yüzdesinin hesaplanmasının hasta ve kontrolleri ayırt etmedeki başarısını değerlendirmek amacıyla ROC analizi yapıldı. ROC eğrisi, belirli bir parametrenin farklı kesme noktaları için yanlış pozitif oranın (100-Özgüllük) fonksiyonunda gerçek pozitif oranın (Hassasiyet) grafiğidir. ROC eğrisindeki her nokta, belirli bir karar eşiğine karşılık gelen bir duyarlılık/özgüllük çiftini temsil eder. ROC eğrisinin altındaki alan (AUC), bir parametrenin iki tanı grubunu (hastalıklı/normal) ne kadar iyi ayırt edebileceğinin bir ölçüsüdür. AUC değeri 1'e ne kadar yakınsa testin doğruluğu o kadar fazladır (166).

Analiz sonucunda eğri altında kalan alan (AUC) değeri istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,001$, $AUC = 0,683$). Youden j index değeri 0,3354 olarak elde edildi. ROC analizi sonucunda optimum duyarlılık ve seçicilik değerine sahip olan kesim noktası değeri **20,3214** olarak elde edildi. Elde edilen kesim noktasına göre klinik verilerle yapılan karşılaştırmalar sonucunda istatistik olarak; paraprotein κ için anlamlı sonuç gözlenirken ($p = 0,014$), cinsiyet, evre, ISS, relaps progresyon ve ilk sıra tedavi bakımından anlamlı bir sonuç gözlenmedi ($p = 0,077$; $p = 0,300$; $p = 0,618$; $p = 0,278$) (Tablo 4.7).

Paraprotein, kanda veya idrarda bulunan ve olgun B hücrelerinin, en yaygın olarak plazma hücreleri veya B lenfositlerinin klonal proliferasyonundan kaynaklanan monoklonal bir immünoglobulin veya immünoglobulin hafif zinciridir. M-proteini olarak da bilinir. Paraproteinler, homojen elektroforetik göç ve ya κ ya da λ olan tek bir hafif zincir tipinin ifadesi ile karakterize edilir. Multiple myelomanın teşhisinde önemlidir (167).

Tablo 4-4: ROC eğrisinin altında kalan alan (AUC)

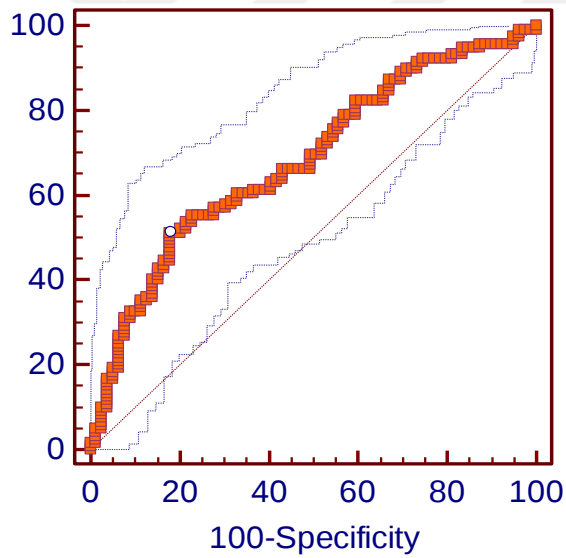
ROC eğrisinin altında kalan alan (AUC)	0,683
Standart Hata ^a	0,0381
95% Güven aralığı ^b	0,613 - 0,747
z istatistiği	4,801
Önem düzeyi P (Alan=0.5)	<0,0001

Tablo 4-5: Youden indeksi

Youden indeksi J	0,3354
95% Güven aralığı ^a	0,2075 - 0,4405
İlişkili kriter	$\leq 20,3214$
95% Güven aralığı ^a	12,2308789 - 22,1051083

Tablo 4-6: ROC eğrisinin ölçüt değerleri

Kriter	Duyarlılık	Özgüllük
$\leq 20,3214$	51,26	82,28

Şekil 4-3: ROC eğrisinin koordinatları**Tablo 4-7: ROC eğrisinin kesim noktasına göre ayrılan hasta gruplarının klinik parametreler bakımından karşılaştırılması**

		>20,32	<20,32	Total	P
		Hasta	Hasta	N (%)	
		N (%)	N (%)		
Cinsiyet	Kadın	36 (%62,1)	28 (%45,9)	64 (%53,8)	0,077
	Erkek	22 (%37,9)	33 (%54,1)	55 (%46,2)	

Paraprotein	κ	34 (%77,3)	27 (%52,9)	61 (%64,2)	0,014
	λ	10 (%22,7)	24 (%47,1)	34 (%35,8)	
Evre	I	4 (%9,1)	10 (%18,9)	14 (%14,4)	0,300
	II	8 (%18,2)	6 (%11,3)	14 (%14,4)	
	III	32 (%72,7)	37 (%69,8)	69 (%71,1)	
ISS	1	16 (%37,2)	15 (%28,3)	31 (%32,3)	0,618
	2	11 (%25,6)	14 (%26,4)	25 (%26)	
	3	16 (%37,2)	24 (%45,3)	40 (%41,7)	
Relaps Progresyon	0	30 (%56,6)	38 (%66,7)	68 (%61,8)	0,278
	1	23 (%43,3)	19 (%33,3)	42 (%38,2)	

5. TARTIŞMA

Multiple myeloma, kemik iliğinde biriken ve M-proteini (monoklonal immünoglobulin veya paraprotein olarak da bilinir) üreten monoklonal plazma hücrelerinin kan kanseridir. Organ disfonksiyonu ile komplike hale gelir: hiperkalsemi, böbrek yetmezliği, anemi ve kemik yıkımı (CRAB kriterleri olarak bilinir). Multiple myeloma neoplastik hastalıkların %1'ini oluşturur ve yüksek gelirli ülkelerde yılda 100.000'de 4,5–6 insidans ile ikinci en yaygın hematolojik malignitedir. Batı Avrupa, Kuzey Amerika ve Avustralya'da insidansın, tanıdaki farklılıklar nedeniyle Asya ve Sahra altı Afrika'dan daha yüksek olduğu belirtilmiştir. 1990'dan 2016'ya, nüfus artışı, yaşlanan dünya nüfusu ve artan yaşa özgü insidans oranları nedeniyle küresel multiple myeloma insidansında %126'lık bir artış olduğu belirtilmiştir(168,169). Multiple myeloma için risk faktörleri arasında obezite, kronik inflamasyon ve pestisitlere, organik çözücülere veya radyasyona maruz kalma yer almaktadır. Kalıtsal genetik varyantlar da multiple myelomun gelişimine katkıda bulunur. 2020'de yayınlanan bir rapor, multiple myeloma ve öncül koşulların insidansı ve sonuçlarında ırksal ve etnik farklılıkları hesaba katan hem kalıtsal hem de toplumsal etkileri özetlemektedir (170,171).

Bu çalışma MM epigenetiği, SOCS-1 gen polimorfizmleri ve hipermetilasyon açısından önemli ve yeni literatür katkılarını içermektedir. Güncel çalışma alanı açısından aydınlatıcı bilgiler sunmaktadır.

Çalışmamıza dahil edilen hastaların medyan yaşı 55 iken sağlıklı kontrol grubunun ise 45'idi. Hastaların %53 erkek iken %47'si kadındı. Amerikan kanser derneğinin yaptığı açıklamaya göre, yaşla birlikte multiple myelom gelişme riski artar. Vakaların %1'den azı 35 yaşından küçük kişilerde teşhis ediliyorken multiple myeloma tanısı konan kişilerin çoğu en az 65 yaşındadır ve erkeklerin multiple myelom geliştirme olasılığı kadınlardan biraz daha fazladır (172). Yaptığımız çalışmada kontrol ve hasta grubu arasında cinsiyet dağılımı açısından anlamlı fark bulunmamaktadır ($p=0,064$) (Tablo 4.1).

Çalışmamızda hastalar ve sağlıklı kontroller arasında SOCS-1 (-1478CA>Del) genotip dağılımı açısından bakıldığında Del/Del genotipi ve Del allelinin hastalarda anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulundu ($p=0,034$)($p=0,001$) (Tablo 4.2). SOCS-1 genotip dağılımının progresyonsuz sağkalım (PFS) ve genel sağkalım (OS) üzerinde hiçbir etkisi olmadığı görüldü (PFS için, $p=0,229$; OS için, $p=0,763$). Hastalar CA/CA, CA/Del, Del/Del genotipleri olarak gruplandırıldığında bile PFS ve OS üzerinde anlamlı bir etki

saptanmadı (PFS için, $p=0,140$; OS için, $p=0,462$) (Tablo 4.3). SOCS-1 gen polimorfizmleri ve metilasyonu literatürde birden fazla çalışma ile ortaya konmuştur. SOCS-1 (-1478, rs33989964), aynı zamanda yüksek ekspresyon seviyeleri ile solunum yolu immün-inflamatuar hastalıkları ile ilişkilendirilmiş bir dinükleotid CA Ekleme/Silme (CA/Del) temsil eder (173). İşlevsel bir SOCS-1 promotör polimorfizminin (-1478CA>Del), Harada ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayla Japon popülasyonunda SOCS-1 transkripsiyonunu arttırdığı gösterilmiştir (174). Hartavi ve ark. kolorektal kanserle ilgili yaptığı çalışmada Del allelinin CA alleleline göre hastalık oluşturma oranı hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılık göstermemiştir ($p=0.27$) (175). Ayyıldız ve ark. kolorektal adenokarsinom (KRK) hastalarında yaptığı çalışmada Del/Del genotipinin hastalısız sağ kalım açısından anlamlı ($p=0,049$) ve daha kötü prognozla ilişki olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, genel sağkalım (OS) analizinde, Del/Del genotipi olan hastaların, CA/CA genotipi olanlara kıyasla 3,9 kat daha fazla mortalite riskine sahip olduğu bulunmuştur ($p=0.05$). Bu hastalarda progresyonsuz sağkalım (PFS) da önemli ölçüde farklıydı ($p=0.05$) (176). Ersoy ve ark. aktif tüberkülozlu hastalarda yaptığı bir başka çalışmada ise hem ARB (aside dirençli bakteri) pozitif hemde negatif hastalarda CA allelinin daha sık olduğu tespit edilmiştir (177). SOCS-1 Del/Del genotipinin MM hastalarında daha sık görülmesi, MM patogenezinde düşük ekspresyonun rolünü de ilk kez ortaya koymaktadır. CA allelindeki artış hastalığa karşı koruyucu, Del allelindeki artış ise hastalığa yakalanmada önemli bir risk faktörü olarak bulundu.

MM epigenetiği, global DNA ve spesifik gen metilasyonları içeren çok fazla literatür ile ortaya konmuştur (178,179). Çalışmamızda SOCS-1 geninin PMR (yüzde metilasyon) değeri sağlıklı kontrollerde hastalara oranla anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0,001$) (Tablo 4.2). Pehlivan ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada MM'li hastalarda sağlıklı kontrollere göre hipermetilasyon anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Tedavi sonrası ölçümlerde global hipermetilasyon, tedavi öncesi duruma kıyasla önemli ölçüde arttı. Adenomatöz polipozis koli-2 promotör genine özgü hipermetilasyon açısından tedavi öncesi ve sonrası değerler arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (180). Komazaki ve ark. yaptığı çalışmada incelenen 14 primer pankreas kanserinden 7'sinde SOCS-1 mRNA'nın belirgin şekilde baskılandığı ve SOCS-1 proteininin azaldığı belgelenmiştir. SOCS-1 geninin yukarıdaki CpG adacıklarının, 14 tümörün 8'inde hipermetile olduğu gösterilmiştir (181). Chun Kang ve ark. kolorektal kanser hastalarında

yaptığı bir diğer çalışmada ise kontrollere kıyasla KRK numunelerinde SOCS-1 hipermetilasyonunun arttığını göstermişlerdir. Metillenmiş SOCS-1, tümörlerde SOCS-1 ekspresyonunun önemli ölçüde baskılanmasıyla ilişkilendirilmiştir. Çalışmada ayrıca, SOCS-1'in azalmış ekspresyonu ile önemli ölçüde ilişkili olan zayıf bir genel hayatta kalma oranı bulunmuştur (182). Çalışmamızda sağlıklı kontrollerin 43,48 ortalama PMR değerine göre yapılan istatistiksel analizde, PMR değeri $<43,48$ olan hastaların anlamlı olarak daha uzun PFS gösterdikleri görüldü ($<43,48$ için %56, $\geq$ için 43,48 %43; $p=0,027$) (Tablo 4-3, Şekil 4-2). Bu iki grup arasında OS açısından anlamlı fark bulunmadı ($p=0,484$) (Tablo 4-3).

SOCS-1 ve MM hastalarında hipermetilasyon ile ilgili farklı çalışmalar bulunmaktadır. Chim ve ark., SOCS-1 hipermetilasyonu açısından anlamlı sonuçlar bulunmazken (183), Galm ve ark. (184), MM hücre hatlarında anormal SOCS-1 metilasyonunun arttığı bulundu. Bu hücre hatlarının demetilasyon ajanı 5-aza-2'-deoksisitidin ile maruz kalması SOCS-1 ekspresyonunu yukarı regüle etmiş ve myeloma tedavisi açısından önemli bir tartışma noktası açmıştır. Bu çalışmada, MM hasta numunelerinin %62,9'unda SOCS-1'in hipermetile olduğu bulunmuştur; SOCS-1'in MM hastalarında hipermetilasyon ile sıklıkla inaktive olduğu sonucuna varılmıştır (184). Depil ve arkadaşlarının çalışmasında, SOCS-1 hipermetilasyonu %75'e kadar gözlemlenirken, hipermetile ve metillenmemiş alt gruplar arasında OS'de anlamlı bir fark yoktu (185). Reddy ve ark., SOCS-1'in MM'li hastalarda hipermetile olduğu ve önemi belirsiz monoklonal gammopati (MGUS) olduğu gösterildi, burada en az bir gen hipermetilasyonu olan hasta sayısı MM'li hastalarda %93 ve MGUS'lu hastalarda %60 idi (186).

Sağlıklı kontrol grubunda anlamlı derecede yüksek SOCS-1 gen PMR değerlerinin bulunması literatürde bir ilktir. Yine sağlıklı kontrolün ortalama PMR değerine göre yapılan analizde, sağkalım analizi açısından bir ilk olan PMR değeri yüksek olan grupta PFS anlamlı olarak daha düşük bulundu. Bu durum metilasyonu azaltan ajanların etkinliği açısından bir ipucu olarak düşünülebilir. Hipometile edici ajanlar arasında yer alan oral azasitidinin (AZA) lenalidomid ve deksametazon ile kombine edildiği bir çalışmada (187), daha önce başarısız olan relaps/refrakter MM olgularında lenalidomidin etkinliği incelenmiştir. ORR %37,5 idi; klinik fayda oranı %50 idi. Medyan OS 10,3 aydı; medyan PFS 2,6 aydı (187). Frederic ve ark. yaptığı başka bir çalışmada (188) relaps/refrakter MM tanısı alan 40 hasta dahil edilmiş ve subkutan AZA'nın etkinliği değerlendirilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen hastaların %30'unda klinik yarar yanıtı elde edilmiştir. AZA, LD ile kombinasyon halinde haftada iki kez deri altından 50 mg/m² hedefine kadar iyi tolere edildi (188). Bir başka önemli çalışmada Khong ve ark. tarafından yapılmıştır. AZA, hem IL-6 reseptör-alfa hem de IL-6'nın işlenmesini inhibe ederek, hem fosfo-STAT3 hem de Bcl-xl'nin ekspresyonunun azalmasına neden oldu. MM patogenezinin temeli olan IL-6'ya karşı antagonist etkileri ve etkinliğinin gelecek için önemli olduğu düşünülmektedir (189). Çalışmamızda daha az metillenmiş SOCS-1 gruplarının daha uzun PFS'ye sahip olması gelecekteki çalışmalar için önemli görünmektedir.

Çalışmamızda metilasyon yüzdesinin hesaplanmasının hasta ve kontrolleri ayırt etmedeki başarısını değerlendirmek amacıyla ROC analizi de yapıldı. Analiz sonucunda eğri altında kalan alan (AUC) değeri istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,001$, $AUC = 0,683$). Youden j index değeri 0,3354 olarak elde edildi. ROC analizi sonucunda optimum duyarlılık ve seçicilik değerine sahip olan kesim noktası değeri 20,3214 olarak elde edildi. Elde edilen kesim noktasına göre klinik verilerle yapılan karşılaştırmalar sonucunda istatistik olarak; paraprotein için anlamlı sonuç gözlenirken ($p = 0,014$), cinsiyet, evre, ISS, relaps progresyon ve bakımından anlamlı bir sonuç gözlenmedi ($p = 0,077$; $p = 0,300$; $p = 0,618$; $p = 0,278$) (Tablo 4.7). Paraprotein (M-proteini) MM'nin teşhisinde önemli bir kriterdir. Analiz sonucunda belirlenen 20,3214 kesim noktası altında kalan hastalarda paraproteinin anlamlı olarak yüksek bulunmasında bu durumu destekler niteliktedir. AUC değeri 1'e ne kadar yakın ise bakılan değişkenin hastalık için yeterliliği o kadar artar. Çalışmamız MM hastalarında SOCS-1 geni için hem yüzde metilasyon hesabı hem de ROC analizini birlikte yapan ilk çalışmadır. Buna göre 0,683 çıkan AUC değeri SOCS-1 gen metilasyonunun MM hastalarında belirleyicilik sağlamakda diğer çalışmalar için ışık tutacaktır.

Çalışmamızın önemli kısıtlılıkları vardı. İlki, istatistiksel analizi sınırlandıran dar hasta popülasyonuydu. İkinci en önemli sınırlılık ise tek merkezli verilerden oluşmasıydı.

Sonuç olarak, çalışmamızda sağlıklı kontrollerde CA/CA genotipi istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunurken, Del/Del genotipi MM'li hastalarda anlamlı olarak daha yüksekti. Del alleli, MM'li hastalarda daha yüksek, CA alleli ise sağlıklı kontrol grubunda daha yüksekti. SOCS-1 geninin PMR değeri sağlıklı kontrol grubunda anlamlı olarak yüksek bulundu. PMR değeri $< 43,48$ olan hastaların önemli ölçüde daha uzun PFS'ye sahip olduğu bulundu. SOCS-1 polimorfizmlerinin MM ve SOCS-1 metilasyonunun patogeneze etkileri literatüre ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

1. Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 2011; **364**: 1046–1060.
2. Galm O, Wilop S, Reichelt J, Jost E, Gehbauer G, Herman JG, Osieka R. DNA methylation changes in multiple myeloma. *Leukemia* 2004; **18**: 1687–1692.
3. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International myeloma working group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014; **15**: 538–548.
4. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2014 Update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2014; **89**: 998–1009.
5. Jiang L, Wei-Xin H, Sai-Qun L, De-Hui X, Shuming S, Yan-Peng W, Xiu-Fen B, Jing L, Jingping H. Promoter methylation induced epigenetic silencing of DAZAP2, adownstream effector of p38/MAPK pathway, in multiple myeloma cells. *Cellular Signalling* 60 2019; 136–145.
6. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 2009; **461(7267)**:1071–1078.
7. Açıkgöz A, Çehreli R, Ellidokuz H. Kadınların kanser konusunda bilgi ve tutumları ile erken tanı yöntemlerine yönelik davranışları. *DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 2011; **25(3)**: 145–154.
8. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; **61(2)**: 69-90.
9. Onur H. Kanser Epidemiyolojisi. *Klinik bilimlere giriş*. **7**: 445–446.
10. Aslan Ö, Vural H, Kömürcü Ş, Özet A. Kemoterapi alan kanser hastalarına verilen eğitimin kemoterapi semptomlarına etkisi. *C.Ü. Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi* 2006; **10(1)**: 15–28.
11. Gizem BA, Özge Ş, Umur A, Sefayi MÖ. Epigenetik ve Kanser. *Madde, Diyalektik ve toplum* 2018; **2(1)**: 94–103.
12. Craddock RB, Adams PF, Usui WM, Mitchell L. An intervention to increase use and effecetiveness of selfcare measures for breast cancer chemotherapy patients. *Cancer Nursing* 1999; **22(4)**: 312–319.
13. Flyge HA. Meeting the challenge of neutropenia. *Nursing* 1993; **23(7)**: 61–64.

14. Miller M, Kearney N. Oral care for patients with cancer: a review of the literature. *Cancer Nursing* 2001; **24(4)**: 241–254.
15. Ertem G, Kalkım A, Bulut S, Sevil Ü. Radyoterapi alan hastaların evde bakım gereksinimleri ve yaşam kaliteleri. *Maltepe Üniversitesi Hemşirelik Bilim ve Sanatı Dergisi* 2009; **2(2)**: 1–10.
16. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010; **31(1)**: 27–36.
17. Chen Z, Wang L, Wang Q, Li W. Histone modifications and chromatin organization in prostate cancer. *Epigenomics* 2010; **2(4)**: 551–560.
18. <https://voer.edu.vn/c/basic-principles-ofgenetics/3ac58449/16798649>. Erişim Tarihi: 25.05.2022.
19. Mottamal M, Zheng S, Huang TL, Wang G. Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. *Molecules* 2015; **20(3)**: 3898–3941.
20. Virani S, Colacino JA, Kim JH, Rozek LS. Cancer epigenetics: a brief review. *ILAR J* 2012; **53(3-4)**: 359–369.
21. Chen QW, Zhu XY, Li YY, Meng ZQ. Epigenetic regulation and cancer (review). *Oncol Rep* 2014; **31(2)**: 523–532.
22. Lakshmaiah KC, Jacob LA, Aparna S, Lokanatha D, Saldanha SC. Epigenetic therapy of cancer with histone deacetylase inhibitors. *J Cancer Res Ther* 2014; **10(3)**: 469–478.
23. Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol Oncol* 2007; **1(1)**: 19–25.
24. Hattori N, Ushijima T. Compendium of aberrant DNA methylation and histone modifications in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; **455(1-2)**: 3–9.
25. Barneda-Zahonero B, Parra M. Histone deacetylases and cancer. *Mol Oncol* 2012; **6(6)**: 579–589.
26. Balasubramanian S, Ramos J, Luo W, Sirisawad M, Verner E, Buggy JJ. A novel histone deacetylase 8 (HDAC8)- specific inhibitor PCI-34051 induces apoptosis in T-cell lymphomas. *Leukemia* 2008; **22**: 1026–1034.
27. <https://www.florence.com.tr/hematoloji> Erişim Tarihi: 25.05.2022

28. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 2019; **144**: 1941–1953.
29. Medinger M, Mross K. Clinical trials with anti-angiogenic agents in hematological malignancies. *J. Angiogenesis Res* 2010; **2**:10.
30. Hedrick EE. Personal communication. *March* 2011; **2**.
31. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. *4th ed. Geneva: World Health Organization* 2008.
32. Das A, Singh A, Gajendra S, Gupta R, Sazawal S, Seth R. An unusual case of phenotype switch between AML FAB subtypes. *Clin. Case Rep* 2015; **3**: 118–120.
33. Miller DR, Leikin S, Albo V, Sather H, Hammond D. Prognostic importance of morphology (FAB classification) in childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *Br. J. Haematol* 1981; **48**: 199–206.
34. Tallman MS. Relevance of pathologic classifications and diagnosis of acute myeloid leukemia to clinical trials and clinical practice. *Cancer Treat Res* 2004; **121**: 45–67.
35. Willman CL. Molecular evaluation of acute myeloid leukemias. *Semin. Hematol* 1999; **36**: 390–400.
36. Gregory TK, Wald D, Chen Y, et al. Molecular prognostic markers for adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *J. Hematol. Oncol* 2009; **2**: 23(10 pp).
37. Rowe JM. Optimal induction and post-remission therapy for AML in first remission. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2009; 396–405.
38. Haase D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 2007; **110**: 4385–4395.
39. Wood BL. Principles of minimal residual disease detection for hematopoietic neoplasms by flow cytometry. *Cytometry B Clin. Cytom* 2015.
40. Deschler B, Lubbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer* 2006; **107**: 2099–2107.

41. Appelbaum FR, Rosenblum D, Arceci RJ, et al. End points to establish the efficacy of new agents in the treatment of acute leukemia. *Blood* 2007; **109**: 1810–1816.
42. Woyach JA, Furman RR, Liu TM, et al. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *New Engl. J. Med.* 2014; **370**: 2286–2294.
43. Asselin B, Rizzari C. Asparaginase pharmacokinetics and implications of therapeutic drug monitoring. *Leuk. Lymphoma* 2015; **11**: 1–8.
44. Masetti R, Pession A. First-line treatment of acute lymphoblastic leukemia with pegasparaginase. *Biologics* 2009; **3**: 359–368.
45. Montserrat E, Moreno C. Chronic lymphocytic leukaemia: a short overview. *Ann. Oncol.* 2008; **19(7)**: 320–325.
46. Yee KW, O'Brien SM. Chronic lymphocytic leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin. Proc.* 2006; **81**: 1105–1129.
47. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 1996; **87**: 4990–4997.
48. Chen YH, Tallman MS, Goolsby C, Peterson L. Immunophenotypic variations in hairy cell leukemia. *Am. J. Clin. Pathol.* 2006; **125**: 251–259.
49. Holzman D. Has success spoiled hairy cell leukemia research? Key questions go unanswered, despite big gains. *Natl Cancer Inst.* 2009; **101**: 370–373.
50. Freyer CW, Gupta N, Wetzler M, Wang ES. Revisiting the role of cladribine in acute myeloid leukemia: an improvement on past accomplishments or more old news? *Am. J. Hematol.* 2015; **90**: 62–72.
51. Maevis V, Mey U, Schmidt-Wolf G, Schmidt-Wolf IG. Hairy cell leukemia: short review, today's recommendations and outlook. *Blood Cancer J.* 2014; **4**: 184.
52. Sigal DS, Miller HJ, Schram ED, Saven A. Beyond hairy cell: the activity of cladribine in other hematologic malignancies. *Blood.* 2010; **116**: 2884–2896.
53. Hauser PM, Burdet FX, Cisse´ OH, et al. Comparative genomics suggests that the fungal pathogen *Pneumocystis* is an obligate parasite scavenging amino acids from its host's lungs. *PLoS One* 2010; **5(12)**: 151–152.

54. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2001; **51**: 15–36.
55. <https://www.florence.com.tr/kan-kanseri> Erişim Tarihi: 25.05.2022.
56. Jabbour EJ, Estey E, Kantarjian HM. Adult acute myeloid leukemia. *Mayo Clin. Proc.* 2006; **81**: 247–260.
57. Schiffer CA. “I am older, not elderly,” said the patient with acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2010; **28**: 521–523.
58. Rowe JM, Tallman MS. How I treat acute myeloid leukemia. *Blood* 2010; **116**: 3147–3256.
59. Rowe JM. Is there a role for intensifying induction therapy in AML? *Best Pract Res Clin Haematol.* 2009.
60. Tallman MS, Altman JK. How I treat acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2009; **114**: 5126–5135.
61. Tallman MS, Abutalib SA, Altman JK. The double hazard of thrombophilia and bleeding in acute promyelocytic leukemia. *Semin. Thromb. Hemost.* 2007; **33**: 330–338.
62. de Thé H, Chen Z. Acute promyelocytic leukaemia: novel insights into the mechanisms of cure. *Nat. Rev. Cancer* 2010; **10**: 775–783.
63. Sessions J. Chronic myeloid leukemia in 2007. *J. Manage. Care Pharm.* 2007; **13(8)**: 4–7.
64. Jamieson CH, Weissman IL, Passegue E. Chronic versus acute myelogenous leukemia: a question of selfrenewal. *Cancer Cell.* 2004; **6**: 531–533.
65. Wei G, Rafiyath S, Liu D. First-line treatment for chronic myeloid leukemia: dasatinib, nilotinib, or imatinib. *J. Hematol. Oncol.* 2010; **3**: 47.
66. Terasawa T, Dahabreh I, Trikalinos TA. BCR-ABL mutation testing to predict response to tyrosine kinase inhibitors in patients with chronic myeloid leukemia. *PLoS Curr.* 2010; **2**: 1204.
67. Baccarani M, Cortes J, Pane F, et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J. Clin. Oncol.* 2009; **27**: 6041–6051.
68. Wittwer C, Hahn M, Kaul K. Rapid cycle real-time PCR-methods and applications. *New York: Springer* 2004; 3–10.

69. Barzi A, Sekeres MA. Myelodysplastic syndromes: a practical approach to diagnosis and treatment. *Cleve. Clin. J. Med.* 2010; **77**: 37–44.
70. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019; **69**: 7–34.
71. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer.* 2012; **12**(5): 335–348.
72. Waldenstrom J. Studies on conditions associated with disturbed gamma globulin formation (gammopathies). *Harvey Lect* 1960; **56**: 211–231.
73. Kyle RA. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. Natural history in 241 cases. *Am J Med* 1978; **64**(5): 814–826.
74. Manier S, Salem KZ, Park J, Landau DA, Getz G, Ghobrial IM. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol* 2017; **14**(2): 100–113.
75. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available online: <https://gco.iarc.fr/today> (accessed on 7 May 2020).
76. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA A Cancer J. Clin.* 2018; **68**: 394–424.
77. Howlander N, Noone AM, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review 1975–2016; National Cancer Institute: Bethesda, MD, USA, 2019.
78. Munshi NC, Jagannath S. Plasma cell neoplasms. In: Hoffman R, Benz EJ, Silberstein LE, Heslop H, Weitz J, Anastasi J, eds. Hematology: Basic Principles and Practice. 6th ed. Philadelphia, Pa: Saunders/Elsevier 2013; 1308–1337.
79. Bianchi G, Anderson KC. Understanding biology to tackle the disease: multiple myeloma from bench to bedside, and back. *CA Cancer J Clin.* 2014; **64**(6): 422–444.
80. Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J Jr. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood.* 2005; **106**: 296–303.

81. Broyl A, Hose D, Lokhorst H, et al. Gene expression profiling for molecular classification of multiple myeloma in newly diagnosed patients. *Blood*. 2010; **116**: 2543–2553.
82. Brigle K, Rogers B. Pathobiology and Diagnosis of Multiple Myeloma. *Semin Oncol Nurs*. 2017; **33(3)**: 225–236.
83. Stella F, Pedrazzini E, Agazzoni M, Ballester O, Slavutsky I. Cytogenetic alterations in multiple myeloma: prognostic significance and the choice of frontline therapy. *Cancer Investig* 2015; **33(10)**: 496–504.
84. Chng WJ, Kumar S, Vanwier S, et al. Molecular dissection of hyperdiploid multiple myeloma by gene expression profiling. *Cancer Res*. 2007; **67**: 2982–2989.
85. Walker BA, Wardell CP, Johnson DC, et al. Characterization of IGH locus breakpoints in multiple myeloma indicates a subset of translocations appear to occur in pregerminal center B cells. *Blood* 2013; **121(17)**: 3413–3419.
86. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol* 2015; **15(3)**: 160–171.
87. Walker BA, Wardell CP, Murison A, et al. APOBEC family mutational signatures are associated with poor prognosis translocations in multiple myeloma. *Nat Commun* 2015b; **6**: 69–97.
88. Bolli N, Li Y, Sathiaselan V, Raine K, Jones D, Ganly P, et al. A DNA target-enrichment approach to detect mutations, copy number changes and immunoglobulin translocations in multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2016; **6(9)**: 467.
89. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun* 2014; **5**: 2997.
90. Sonneveld P, Avet-Loiseau H, Lonial S, et al. Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the international myeloma working group. *Blood* 2016; **127(24)**: 2955–2962.
91. Lawasut P, Groen RW, Dhimolea E, Richardson PG, Anderson KC, Mitsiades CS. Decoding the pathophysiology and the genetics of multiple myeloma to identify new therapeutic targets. *Semin Oncol* 2013; **40(5)**: 537–548.

92. Chng WJ, Dispenzieri A, Chim CS, et al. IMWG consensus on risk stratification in multiple myeloma. *Leukemia* 2014; **28(2)**: 269–277.
93. Hultcrantz M, Morgan GJ, Landgren O. Epidemiology and Pathophysiology of Multiple Myeloma. In: Dimopoulos M, Facon T, Terpos E. (eds) *Multiple Myeloma and Other Plasma Cell Neoplasms. Hematologic Malignancies. Springer, Cham.* 2018; 1–15.
94. Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, et al. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell* 2014; **25(1)**: 91–101.
95. Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, van Duin M, Sonneveld P, Mateos MV, Gay F, Anderson KC. Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Primers.* 2017; **20(3)**: 1–20.
96. Cyster, J. G. Homing of antibody secreting cells. *Immunol. Rev.* 2003; **19**: 48–60.
97. Zhu D, Wang Z, Zhao JJ, et al. The cyclophilin A–CD147 complex promotes the proliferation and homing of multiple myeloma cells. *Nat. Med.* 2015; **21**: 572–580.
98. Ghobrial IM. Myeloma as a model for the process of metastasis: implications for therapy. *Blood* 2012; **120**: 20–30.
99. Roodman GD. Mechanisms of bone lesions in multiple myeloma and lymphoma. *Cancer* 1997; **80**: 1557–1563.
100. Roodman GD. Pathogenesis of myeloma bone disease. *Leukemia* 2009; **23**: 435–441.
101. Roccaro AM, Sacco A, Maiso P, et al. BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *J. Clin. Invest.* 2013; **123**: 1542–1555.
102. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2005; **102**: 13944–13949.
103. Roccaro AM, Sacco A, Thompson B, et al. MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma. *Blood* 2009; **113**: 6669–6680.

104. Rajkumar SV. Treatment of multiple myeloma. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; **8**: 479–491.
105. Rajkumar SV, Gahrton G, Bergsagel PL. Approach to the treatment of multiple myeloma: a clash of philosophies. *Blood* 2011a; **118**: 3205–3211.
106. Kumar SK, Dispenzieri A, Lacy MQ, et al. Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia* 2014; **28**: 1122–1128.
107. Rajkumar SV, Merlini G, San Miguel JF. Redefining myeloma. *Nat Rev Clin Oncol* 2012; **9**: 494–496.
108. Mateos MV, Hernández MT, Giraldo P, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for high-risk smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med* 2013; **369**: 438–447.
109. Yong K, Delforge M, Driessen C, Fink L, Flinois A, Gonzalez McQuire S, Safaei R, Karlin L, Mateos MV, Raab MS, Schoen P, Cavo M. Multiple myeloma: patient outcomes in real-world practice. *Br. J. Haematol.* 2016; **175(2)**: 252–264.
110. Rajkumar SV, Fonseca R, San Miguel JF. Diagnosis and Staging of Multiple Myeloma and Related Disorders. In: Dimopoulos M, Facon T, Terpos E. (eds) *Multiple Myeloma and Other Plasma Cell Neoplasms. Hematologic Malignancies. Springer, Cham.* 2018; 17–28.
111. Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 2009; **462(7271)**: 315–322.
112. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 2007; **128(4)**: 635–638.
113. Umer M, Herceg Z. Deciphering the Epigenetic Code: An Overview of DNA methylation Analysis Methods. *Antioxid Redox Signal* 2012; (Epub ahead of print).
114. Zuo T, Tycko B, Liu TM, Lin JJ, Huang TH. Methods in DNA methylation profiling. *Epigenomics* 2009; **1(2)**: 331–345.
115. Goel A. DNA methylation-based fecal biomarkers for the noninvasive screening of GI cancers. *Future Oncol* 2010; **6(3)**: 333–336.

116. Nguyen C, Liang G, Nguyen TT, Tsao-Wei D, Groshen S, Lubbert M, Zhou JH, Benedict WF, Jones PA. Susceptibility of nonpromoter CpG islands to de novo methylation in normal and neoplastic cells. *J Natl Cancer Inst* 2001; **93(19)**: 1465–1472.
117. Ndlovu MN, Denis H, Fuks F. Exposing the DNA methylome iceberg. *Trends Biochem Sci* 2011; **36(7)**: 381–387.
118. Smallwood SA, Kelsey G. De novo DNA methylation: a germ cell perspective. *Trends Genet* 2012; **28(1)**: 33–42.
119. Miller CA, Sweatt JD. Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron* 2007; **53(6)**: 857–869.
120. Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 2006; **31(2)**: 89–97.
121. Robertson KD. DNA methylation and chromatin – unraveling the tangled web. *Oncogene* 2002; **21(35)**: 5361–5379.
122. Li Y, Tollefsbol TO. Impact on DNA methylation in cancer prevention and therapy by bioactive dietary components. *Curr Med Chem* 2010; **17(20)**: 2141–2151.
123. Jurkowska RZ, Rajavelu A, Anspach N, Urbanke C, Jankevicius G, Ragozin S, Nellen W, Jeltsch A. Oligomerization and binding of the Dnmt3a DNA methyltransferase to parallel DNA molecules: heterochromatic localization and role of Dnmt3L. *J Biol Chem* 2011; **286(27)**: 24200–24207.
124. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones AP. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004; **429**: 457–463.
125. Robertson DK. DNA methylation and human disease. *Nature Rev Genet* 2005; **6**: 597–610.
126. Ebrahimia V, Soleimania A, Ebrahimid T, Azargune R, Yazdania P, Eyvazif S, Tarhriza V. Epigenetic modifications in gastric cancer: Focus on DNA methylation. *Gene* 2020; **742(144577)**: 1–7.
127. Kanwal R, Gupta S. Epigenetic modifications in cancer. *Clin Genet* 2012; **81(4)**: 303–311.
128. İzmirli M. Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser Tedavisinde Epigenetik Yaklaşımlar. *Van Tıp Dergisi* 2013; **20(1)**: 48–51.

129. Sandoval J, Esteller M. Cancer epigenomics: beyond genomics. *Curr Opin Genet Dev* 2012; **22(1)**: 50–55.
130. Ehrlich M. DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics* 2009; **1(2)**: 239–259.
131. Fraga MF, Herranz M, Espada J, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Erkek E, Bozdogan O, Peinado H, Niveleau A, Mao JH, Balmain A, Cano A, Esteller M. A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors. *Cancer Res* 2004; **64(16)**: 5527–5534.
132. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; **128(4)**: 683–692.
133. Kim YI, Giuliano A, Hatch KD, et al. Global DNA hypomethylation increases progressively in cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer* 1994; **74(3)**: 893–899.
134. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer* 2011; **11(10)**: 726–734.
135. Gros C, Fahy J, Halby L, Dufau I, Erdmann A, Gregoire JM, Ausseil F, Vispe S, Arimondo PB. DNA methylation inhibitors in cancer: Recent and future approaches. *Biochimie* 2012; **94(11)**: 2280–2296.
136. Yaykaşlı KO, Hatipoğlu ÖF, Kaya E, Yaykaşlı E. Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser. *Düzce Tıp Dergisi* 2012; **14(3)**: 58–68.
137. Özgür E, Tıǧlı H, Tıǧlı H. İnsan Hastalıklarında Epigenetiğin Rolüne Klinik Bakış. *IGUSABDER* 2020; **10**: 107–122.
138. Baylin SB, Jones PA. Epigenetic determinants of cancer. *Cold Spring Harb.Perspect. Biol.* 2016; **8(9)**: 019505.
139. Nüsgen N, Goering W, Dauksa A, et al. Inter-locus as well as intra-locus heterogeneity in LINE-1 promoter methylation in common human cancers suggests selective demethylation pressure at specific CpGs. *Clin Epigenetics*. 2015; **1**: 7–17.
140. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nature Rev. Cancer* 2004; **4**: 1–11.
141. Liang G, Weisenberger DJ. DNA methylation aberrancies as a guide for surveillance and treatment of human cancers. *Epigenetics* 2017.

142. Hoffman RM. Is DNA methylation the new guardian of the genome? *Mol Cytogenet* 2017; **10**: 11.
143. Alzrigat M, Párraga AA, Jernberg-Wiklund H. Epigenetics in multiple myeloma: From mechanisms to therapy. *Semin Cancer Biol.* 2018; **51**:101–115.
144. Houde C, Li Y, Song L, et al. Overexpression of the NOTCH ligand JAG2 in malignant plasma cells from multiple myeloma patients and cell lines. *Blood* 2004; **104**: 3697–3704.
145. Danielle L, Krebs PhD, Douglas JH. SOCS Proteins: Negative Regulators of Cytokine Signaling, *Stem Cells* 2001; **19(5)**: 378–387.
146. Nicola NA. An introduction to the cytokines. In: Nicola NA, ed. *Guidebook to Cytokines and Their Receptors. Oxford: Oxford University Press* 1994; 1–7.
147. Koytiger G, Kaushansky A, Gordus A, Rush J, Sorger PK, MacBeath G. "Phosphotyrosine signaling proteins that drive oncogenesis tend to be highly interconnected". *Molecular & Cellular Proteomics*. 2013; **12(5)**: 1204–1213.
148. Darnell JE. STATs and gene regulation. *Science* 1997; **277**: 1630–1635.
149. Durham GA, Williams JJL, Nasim MT, Palmer TM. Targeting SOCS Proteins to Control JAK-STAT Signalling in Disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2019; **40(5)**: 298–308.
150. Schwartz DM, Bonelli M, Gadina M, et al. Type I/II cytokines, JAKs, and new strategies for treating autoimmune diseases. *Nat. Rev. Rheuma-tol.* 2016; **12**: 25–36.
151. Wang B, Wangkahart E, Secombes CJ, Wang T. Insights into the Evolution of the Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS) Gene Family in Vertebrates, *Molecular Biology and Evolution*, 2019; 36(2): 393–411.
152. Campbell KS, Purdy AK. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology* 2011; **132(3)**: 315–325.
153. Jager LD, Dabelic R, Waiboci LW, Lau K, Haider MS, Ahmed CM, Larkin J, David S, Johnson H M. The kinase inhibitory region of SOCS-1 is sufficient to inhibit T-helper 17 and other immune functions in experimental

- allergic encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* 2011; **232(1-2)**: 108–118.
154. Mao Y. Structure, Dynamics and Function of the 26S Proteasome. In: Harris JR, Marles-Wright, J. (eds).. *Macromolecular Protein Complexes III: Structure and Function. Subcellular Biochemistry, Springer, Cham* 2021; 96.
 155. Fujimoto M, Naka T. Regulation of cytokine signaling by SOCS family molecules. *Trends Immunol.* 2003; **24(12)**: 659–666.
 156. Delgado-Ortega M, Marc D, Dupont J, Trapp S, Berri M, Meurens F. SOCS proteins in infectious diseases of mammals. *Vet Immunol Immunopathol.* 2013; **15;151(1-2)**: 1–19.
 157. Cassel SL, Rothman PB. Chapter 3: Role of SOCS in allergic and innate immune responses. *Adv Immunol.* 2009; **103**: 49–76.
 158. https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SOCS1#genomic_location. Erişim Tarihi: 24.05.2022
 159. <https://www.drozdogan.com/polimeraz-zincir-reaksiyonu-nedir-pcr-tarihcesi-nasil-yapilir/> Erişim Tarihi: 23.05.2022.
 160. Guedes RA, Planello AC, Andia DC, De Oliveira NF, de Souza AP. Association of SOCS1 (- 820) (rs33977706) gene polymorphism with chronic periodontitis: A case-control study in Brazilians. *Meta Gene.* 2015; **9(5)**: 124–128.
 161. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV, Laird PW. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2000; **28(8)**: 32.
 162. Sigalotti L, Covre A, Colizzi F, Fratta E. Quantitative Methylation-Specific PCR: A Simple Method for Studying Epigenetic Modifications of Cell-Free DNA. *Methods Mol Biol.* 2019; **1909**: 137–162.
 163. <https://ardimed.com/faydali-bilgi/epigenetik-nedir> Erişim Tarihi: 24.05.2022
 164. Chan MW, Chu ES, To KF, Leung WK. Quantitative detection of methylated SOCS-1 , a tumor suppressor gene, by a modified protocol of quantitative real time methylation-specific PCR using SYBR green and its use in early gastric cancer detection. *Biotechnol Lett.* 2004; **26(16)**: 1289–1293.

165. Li B, Chen X, Jiang Y, Yang Y, Zhong J, Zhou C, Hu H, Duan S. CCL2 promoter hypomethylation is associated with gout risk in Chinese Han male population. *Immunol Lett.* 2017; **190**: 15–19.
166. <https://www.medcalc.org/manual/roc-curves.php> Erişim Tarihi: 24.05.2022
167. Cook L, Macdonald DH. Management of paraproteinaemia. *Postgraduate medical journal* 2007; **83(978)**: 217–223.
168. Cowan AJ, Allen C, Barac A, et al. Global burden of multiple myeloma: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *JAMA Oncol* 2018; **4**: 1221–1227.
169. van de Donk NWCJ, Pawlyn C, Yong KL. Multiple myeloma. *Lancet.* 2021; **397(10272)**: 410–427.
170. Went M, Sud A, Försti A, et al. Identification of multiple risk loci and regulatory mechanisms influencing susceptibility to multiple myeloma. *Nat Commun* 2018; **9**: 3707.
171. Vachon CM, Kyle RA, Therneau TM, et al. Increased risk of monoclonal gammopathy in first-degree relatives of patients with multiple myeloma or monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2009; **114**: 785–790.
172. www.cancer.org/cancer/multiple-myeloma.html Erişim Tarihi: 24.05.2022
173. Brand S, Zitzmann K, Dambacher J, et al. SOCS-1 inhibits expression of the antiviral proteins 2',5'-OAS and MxA induced by the novel interferon-lambdas IL-28A and IL-29. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **3;331(2)**: 543–548.
174. Harada M, Nakashima K, Hirota T, et al. Functional polymorphism in the suppressor of cytokine signaling 1 gene associated with adult asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; **36(4)**: 491–496.
175. Hartavi M, Kurt E, Oral B, Olmez OF, Cubukcu E, Deligonul A, Avci N, Manavoglu O. The SOCS-1 -1478CA/del polymorphism is not associated with colorectal cancer or age at onset in Turkish subjects. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013; **14(12)**: 7583–7586.

176. Ayyildiz T, Dolar E, Oral B, Erturk B, Haktanir AE, Adim SB, Yerci O. SOCS-1 1478 CA/del gene polymorphism affects survival in colorectal carcinoma. *Niger J Clin Pract.* 2022; **25(3)**: 239–247.
177. Ersoy L, Özçimen A, Ülger M, Çalikoğlu M, Aslan G. Aktif Tüberkülozlu Türk Hastalarda Sitokin Sinyali Baskılayıcı Gen Polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi. *Turk J Immunol* 2021; **9(3)**: 114–119.
178. Yang T, Liu X, Kumar SK, Jin F, Dai Y. Decoding DNA methylation in epigenetics of multiple myeloma. *Blood Rev* 2021; **31**: 100872.
179. Robak P, Drozd I, Szemraj J, Robak T. Drug resistance in multiple myeloma. *Cancer Treat Rev* 2018; **70**: 199–208.
180. Pehlivan S, Serin I, Nursal AF, Oyaci Y, Gundes I, Pehlivan M. What are the roles of global DNA and APC2 gene promotor hypermethylation in multiple myeloma? *Mol Biol Rep* 2021; **48 (12)**: 7875–7882.
181. Komazaki T, Nagai H, Emi M, Terada Y, Yabe A, Jin E, Kawanami O, Konishi N, Moriyama Y, Naka T, Kishimoto T. Hypermethylation-associated inactivation of the SOCS-1 gene, a JAK/STAT inhibitor, in human pancreatic cancers. *Jpn J Clin Oncol.* 2004; **34(4)**: 191–194.
182. Kang XC, Chen ML, Yang F, Gao BQ, Yang QH, Zheng WW, Hao S. Promoter methylation and expression of SOCS-1 affect clinical outcome and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Biomed Pharmacother.* 2016; **80**: 23–29.
183. Chim CS, Fung TK, Cheung WC, Liang R, Kwong YL. SOCS1 and SHP1 hypermethylation in multiple myeloma: implications for epigenetic activation of the Jak/STAT pathway. *Blood* 2004; **15;103(12)**: 4630–4635.
184. Galm O, Yoshikawa H, Esteller M, Osieka R, Herman JG. SOCS-1, a negative regulator of cytokine signaling, is frequently silenced by methylation in multiple myeloma. *Blood* 2003; **101**: 2784–2788.
185. Depil S, Saudemont A, Quesnel B. SOCS-1 gene methylation is frequent but does not appear to have prognostic value in patients with multiple myeloma. *Leukemia* 2003; **17**: 1678–1679.
186. Reddy J, Hivapurkar N, Takahashi T, et al. Differential methylation of genes that regulate cytokine signaling in lymphoid and hematopoietic tumors. *Oncogene* 2005; **20;24(4)**: 732–736.

187. Kalff A, Khong T, Mithraprabhu S, et al. Oral azacitidine (CC-486) in combination with lenalidomide and dexamethasone in advanced, lenalidomide-refractory multiple myeloma (ROAR study). *Leuk Lymphoma* 2019; **60(9)** : 2143–2151.
188. Frederic JR, et al. *Journal of Clinical Oncology* 2015; **33(15)**: 8584.
189. Khong T, Sharkey J, Spencer A. The effect of azacitidine on interleukin-6 signaling and nuclear factor-kappaB activation and its in vitro and in vivo activity against multiple myeloma. *Haematologica* 2008; **93(6)**: 860–869.



FORMLAR

GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Sayın,

Multiple Myeloma bir malign kanser çeşididir. Tüm hematolojik kanserlerin yaklaşık %10'unu oluşturduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Bilindiği gibi kanser radyasyon, UV, yanlış beslenme gibi dış etmenlerden ortaya çıktığı gibi kanser tipine göre spesifik gösteren genlerde meydana gelen mutasyonlar gibi genetik değişikliklerle de meydana gelmektedir. Bireylerin genetik özellikleri anne ve babadan gelen, gen adı verilen yapılar ile belirlenmektedir. Genler bireye ait tüm özelliklerin bilgisini taşır. Multipl Myeloma hastalarının genetik açıdan incelenmesi, teşhiste ve tedavinin yönlendirilmesinde büyük öneme sahiptir. Bu araştırmada amaç; multipl myeloma hastalarında, hastalığa neden olduğu düşünülen genlerdeki metilasyon analizi verileriyle hastalarda erken teşhis ve tedavi başarısını öngörmek ve uygun tedavi seçeneklerine katkısını belirlemektir.

Sizlerden madde bağımlılığında rolü olduğu bildirilen genleri araştırmak üzere bir tüp kan örneği alıp “Kemik İliği Nakli Yapılan Multipl Myeloma Hastalarındaki Epigenetik Farklılıkların Araştırılması ve Klinik Parametrelerle Karşılaştırılması” başlıklı çalışmamız için kullanacağız. Bildiğiniz gibi böylesi az miktarda kan vermenin neredeyse hiçbir yan etkisi yoktur. Olası yan etkiler arasında baş dönmesi ve tansiyon düşmesine bağlı hafif baygınlık hissi sayılabilir. Böyle durumlarda kişi düz bir zeminde birkaç dakika uzanarak, gerekirse ayakları havaya kaldırılarak bu hali atlatabilir. Alınan kan ile yapılacak genetik araştırmalar İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilecektir. Yer aldığınız bu araştırmada öngörülen süre 12 ay olup, araştırmada yer alacak gönüllülerin sayısı 200’dir.

Bu çalışmanın sizin için herhangi bir masrafı yoktur. Verdiğiniz kan bağış olup, kan veren ve çalışmayı yapanın ticari bir kazanç beklentisi yoktur. Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayımlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Ayrıca size ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, başka merkezlere yollanması ve işlenmesi konusunda bu çalışmayı yapan kişilere yetki veriyorsunuz.

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; bu durum herhangi bir cezaya ya da sizin yararlarınıza engel duruma yol aēmayacaktır. Araştırıcı gerekli gördüğü durumlarda sizi araştırmadan çıkarabilir.

Katılımcının/Hastanın Beyanı

Prof.Dr. Mustafa Pehlivan tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya ‘‘katılımcı’’ (denek) olarak davet edildim. Eğer araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük  zen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağının bilincindeyim). Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır. İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde ‘‘katılımcı’’ (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Araştırma konusu hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün,

Adı-Soyadı:

Adresi:

Tel-Faks:

Tarih ve İmza:

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin,

Adı-Soyadı:

Adresi:

Tel- Faks:

Tarih ve İmza:

Açıklamaları yapan araştırmacının,

Adı-Soyadı:

Görevi:

Adresi:

Tel-Faks:

Tarih ve İmza:

Olur alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin/görüşme tanığının,

Adı-Soyadı:

Görevi:

Adresi:

Tel-Faks:

Tarih ve İmza:

ETİK KURUL KARARI

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KEMİK İLİĞİ NAKLİ OLAN MULTİPLE MYELOMA HASTALARINDA
EPIGENETİK/GENETİK FARKLILIKLARIN ARAŞTIRILMASI VE
KLİNİK PARAMETRELERLE KARŞILAŞTIRILMASI

ORJİNALLIK RAPORU

% 18	% 17	% 8	% 9
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 3
2	www.tipdergi.duzce.edu.tr İnternet Kaynağı	% 2
3	www.thefreelibrary.com İnternet Kaynağı	% 1
4	bilimveaydinlanma.org İnternet Kaynağı	% 1
5	acikerisim.gelisim.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
6	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
7	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 1
8	epdf.pub İnternet Kaynağı	% 1

ÖZGEÇMİŞ

