

**T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**VİTAMİN D3'ÜN MULTİPLE MYELOMA
HÜCRELERİNDE UZUN KODLAYICI OLMAYAN
RNA (LNCRNA) İFADESİNE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Kübra Nur BOSTANCI

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ayşe KIZILYER

BURDUR, 2024

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca **Yüksek Lisans Tezi** olarak sunduğum “**Vitamin D3’ün Multiple Myeloma Hücrelerinde Uzun Kodlayıcı Olmayan RNA (lncRNA) İfadesine Etkisinin İncelenmesi**” başlıklı bu tezin;

- Kendi çalışmam olduğunu,
- Sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi,
- Bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi,
- Kullandığım verilerde değişiklik yapmadığımı,
- Tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı,
- Bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı,

bildirir, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

13.06.2024

(İmza)

Kübra Nur BOSTANCI

ÖNSÖZ

Bu araştırmanın her aşamasında engin bilgilerini ve tecrübesini esirgemeyen beni her zaman destekleyen, araştırmaya ve sorgulamaya yönelten değerli danışman hocam **Dr. Öğr. Üyesi Ayşe KIZILYER** 'e teşekkürlerimi sunarım.

Tezim sırasında cihazlarını kullandığım MAKÜ BİLTEKMER'e teşekkürlerimi sunarım.

0883-YL-23 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Eğitim hayatım şekillenmesinde büyük rolü olan değerli hocalarım Doç. Dr. Şenol ALAN'a ve Yüksek Biyolog Tuğba SARIŞAHİN'e teşekkür ederim.

Eğitim sürem boyunca yanımda olan ve beni her zaman destekleyen yol arkadaşım Oğuzhan AYAR'a ve ailesine teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım dahil hayatımın hiçbir evresinde beni yalnız bırakmayan, bana güç veren, yol gösteren kıymetli abilerim; Mehmet Salih BOSTANCI, Ömer Faruk BOSTANCI ve Tefik Fikret BOSTANCI'ya çok teşekkür ederim.

Eğitim hayatımın başından sonuna bana tüm imkânlarını sunan, bu günlere gelmemi sağlayan, başta canım annem Güler BOSTANCI olmak üzere biricik babam Müslüm BOSTANCI'ya ve aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Haziran, 2024

Kübra Nur BOSTANCI

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Multiple Myeloma.....	4
2.1.1. B Hücresinin Kökeni	4
2.1.2. B Hücresinin Olgunlaşma Süreci	5
2.2. MM Teşhis Kriterleri.....	7
2.3. MM’de Tedavi Yöntemleri	8
2.4. Kemik İliği Mikroçevresi	9
2.5. Vitamin D Metabolizması	10
2.6. Vitamin D/VDR Aracılığıyla Düzenlenen İşlevler	11
2.7. MM’de Epigenetik Faktörler.....	12
2.8. Uzun Kodlayıcı Olmayan RNA’lar	13
2.8.1. LncRNA’lar ile Etkileşimdeki Moleküller	14
2.8.2. H19	15
2.8.3. MEG3	18
2.8.4. NEAT1.....	19
2.8.5. TUG1	20
2.8.6. UCA1	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1. Alet ve Cihazlar.....	22
3.2. Kimyasallar	23
3.3. Hücre Kültürü Uygulamaları.....	24
3.3.1. Hücre Canlandırma ve Hücre Kültürü	24
3.3.2. Vitamin D Solüsyonunun Hazırlanması	25
3.3.3. Carfilzomib (CFZ) Solüsyonunun Hazırlanması	25
3.4. MTT analizi	25
3.5. NCI-H929 Hücrelerine Vitamin D Uygulaması.....	26
3.6. NCI-H929 Hücrelerine Carfilzomib Uygulaması	26
3.7. NCI-H929 Hücrelerine Vitamin D ve Carfilzomibin Birlikte Uygulanması	26
3.8. Total RNA İzolasyonu.....	26
3.9. cDNA Sentezi.....	27
3.9. PCR Primeri Tasarımı	28
3.10. Gradyent PCR ile Primerlerin Optimizasyonu.....	29
3.11. Agaroz Jel Elektroforezi.....	29
3.12. Kantitatif Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR).....	30
3.13. İstatistiksel Analiz	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	32
4.1. Vitamin D’nin NCI-H929 Hücrelerinin Canlılığına Etkisi	32
4.2. Vitamin D’nin Transkripsiyonel Aktivesinin Tespiti.....	33

4.3. Vitamin D Uygulamasının H19 Geni İfadesine Etkisi	36
4.4. Vitamin D Uygulamasının MEG3 Geni İfadesine Etkisi	37
4.5. Vitamin D Uygulamasının NEAT1 Geni İfadesine Etkisi	39
4.6. Vitamin D Uygulamasının TUG1 Geni İfadesine Etkisi.....	40
4.7. Vitamin D Uygulamasının UCA1 Geni İfadesine Etkisi	41
4.8. Vitamin D-Carfilzomib Kombine Uygulamasının NCI-H929'un Canlılığına Etkisi	43
4.9. Vitamin D-Carfilzomib Kombine Uygulamasının VDR ve CYP24A1 Genlerinin İfadesine Etkisi.....	45
4.10. Vitamin D-Carfilzomib Kombine Uygulamasının H19 Geni İfadesine Etkisi .	46
4.11. Vitamin D-Carfilzomib Kombine Uygulamasının MEG3 Geni İfadesine Etkisi	48
4.12. Vitamin D-Carfilzomib Kombine Uygulamasının NEAT1 Geni İfadesine Etkisi	49
4.13. Vitamin D-Carfilzomib Kombine Uygulamasının TUG1 Geni İfadesine Etkisi	50
4.14. Vitamin D-Carfilzomib Kombine Uygulamasının UCA1 Geni İfadesine Etkisi	51
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	54
KAYNAKLAR	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. B hücrenin kökeni	4
Şekil 2.2. B hücre farklılaşması	6
Şekil 2.3. MM'nin gelişim evreleri.....	7
Şekil 2.4. Kemik iliği mikroçevresindeki hücre çeşitliliği	9
Şekil 2.5. Vitamin D'nin metabolizması.....	11
Şekil 2.6. lncRNA'nın etkileşimde bulunduğu moleküller.....	15
Şekil 2.7. lncRNA H19 ve vitamin D'nin ortak miRNA hedefleri.....	16
Şekil 3.1. Tez çalışmasının iş akışı	24
Şekil 3.2. PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	30
Şekil 4.1. Vitamin D uygulaması sonrası NCI-H929 hücre canlılığı grafiği.....	33
Şekil 4.2. Hedef lncRNA genlerinin promotör dizilerinde tanımlanan VDR yanıt elementlerinin konumu	34
Şekil 4.3. NCI-H929 hücrelerinin Vitamin D ile 24, 48 saat muamelesi sonucu VDR ve CYP24A1 genlerinin ifade değişimi	35
Şekil 4.4. NCI-H929'a 24 ve 48 saatlik farklı dozlarda vitamin D uygulaması sonrası H19 geni ifade değişimi	36
Şekil 4.5. NCI-H929'a 24 ve 48 saatlik süreyle farklı dozlarda vitamin D uygulaması sonrası MEG3 geni ifade değişimi	38
Şekil 4.6. NCI-H929'a 24 ve 48 saatlik vitamin D uygulaması sonrası NEAT1 ifadesi değişimi	39
Şekil 4.7. NCI-H929'a 24 ve 48 saatlik vitamin D uygulaması sonrası TUG1 geni ifade değişimi	41
Şekil 4.8. NCI-H929'a 24 ve 48 saatlik vitamin D uygulaması sonrası UCA1 geni ifade değişimi	42
Şekil 4.9. Carfilzomib uygulamasının NCI-H929 hücre canlılığına etkisi.....	44
Şekil 4.10. NCI-H929'a 24 saat vitamin D ile kombine carfilzomib uygulamasının hücre canlılığına etkisi	45
Şekil 4.11. NCI-H929'a vitamin D ile kombine carfilzomib uygulamasından 24 saat sonra VDR ve CYP24A1 ifadesindeki değişim	46
Şekil 4.12. NCI-H929'da 24 saat vitamin D-CFZ kombine uygulaması sonrası H19 ifadesinin değişimi	47

Şekil 4.13. NCI-H929’da 24 saat vitamin D-CFZ kombine uygulaması sonrası MEG3 ifadesinin değişimi	48
Şekil 4.14. NCI-H929’da 24 saat vitamin D-CFZ kombine uygulaması sonrası NEAT1 ifadesinin değişimi	49
Şekil 4.15. NCI-H929’da 24 saat vitamin D-CFZ kombine uygulaması sonrası TUG1 ifadesinin değişimi	50
Şekil 4.16. NCI-H929’da 24 saat vitamin D-CFZ kombine uygulaması sonrası UCA1 ifadesinin değişimi	52



ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Deney sırasında kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları	22
Çizelge 3.2. Deney sırasında kullanılan sarflar ve kimyasallar_	23
Çizelge 3.3. DNase I muamelesi.....	27
Çizelge 3.4. cDNA sentez kiti bileşenleri	28
Çizelge 3.5. cDNA sentezi için PCR sıcaklıkları ve süreleri	28
Çizelge 3.6. Hedef genlere özgü tasarlanan primer dizileri.....	29
Çizelge 3.7. PCR bileşenleri	30
Çizelge 3.8. PCR programı	31

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AID	: Aktivasyonla Uyarılan Sitidin Deaminaz
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
ATG2B	: Otofaji ile İlişkili Protein Homolog 2 B
BAP	: Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
Bcl-2	: B Hücreli Lenfoma 2
BCR	: B Hücre Reseptörü
BRD4	: Bromodomain İçeren Protein 4
BMP4	: Kemik Morfogenetik Proteini 4
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
CDR	: Tamamlayıcılık Belirleyici Bölge
c/EBPA	: CCAAT/artırıcı bağlayıcı protein alfa
CFZ	: Carfilzomib
C-MYC	: Çok İşlevli Bir Transkripsiyon Faktörü
CO₂	: Karbondioksit
CRAB	: Hiperkalsemi, Böbrek Yetmezliği, Anemi, Kemik Lezyonu
CSR	: Sınıf Değiştirme Rekombinasyonu
CT	: Bilgisayarlı tomografi
CYP27A1	: Sterol 27-hidroksilaz
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNMT	: DNA Metiltransferaz
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EPD	: Ökaryotik Promotör Veritabanı
ETOH	: Etanol
EZH2	: Zeste 2 Polycomb Baskılayıcı Kompleks 2 Alt Biriminin Güçlendiricisi
FBS	: Fetal Bovine Serum
FDA	: Food And Drug Administration
FISH	: Floresan In Situ Hibridizasyon
FLC	: Serum Serbest Hafif Zincir
GAPDH	: Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz
H19	: Baskılanmış, Anne Tarafından İfade Edilen Transkript
HCl	: Hidroklorik Asit
HIF-1α	: Hipoksiye Duyarlı Faktör 1-Alfa

HRE	: Hormon Yanıt Elemanı
HOXA	: Homeobox A1
Ig	: İmmünoglobulin
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL6	: İnterlökin 6
JAK2	: Janus kinaz 2
JASPAR	: Transkripsiyon Faktörü Bağlama Profilleri Veritabanı
Kb	: Kilobaz
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
LncRNA	: Uzun Kodlayıcı Olmayan RNA
MCL-2	: İndüklenmiş Miyeloid Lösemi Hücre Farklılaşma Proteini
MEG3	: Anne Tarafından İfade Edilen Gen 3
MGUS	: Monoklonal Gamopati
MiRNA	: MikroRNA
MM	: Multiple Myeloma
mTOR	: Rapamisin Protein Kompleksinin Memeli Hedefi
ncRNA	: Noncoding RNA
NEAT1	: Nükleer Paraspeckle Düzeneci Transkripti 1
NF-κB	: Nükleer Faktör-kappa B
nk	: Nükleotit
nm	: Nanometre
nM	: Nanomolar
NRF-2	: Nükleer Faktör Eritroid 2
PET	: Pozitron Emisyon Tomografisi
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PI	: Proteazom İnhibitörü
PI3K	: Fosfoinositid-3-Kinaz
PTBP1	: Polipirimidin Bağlayıcı Protein 1
PTH	: Paratiroid Hormon
PRC2	: Polcomb Baskılayıcı Kompleks 2
RAG1/2	: Rekombinasyon Aktive Edici Genler 1/2
RB	: Retinoblastoma Protein
RPMI	: Rosewell Park Memorial Institute

RXR	: Retinoid X Reseptörü
QRT-PCR	: Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SHM	: Somatik Hipermutasyon
SMM	: Smoldering Multiple Myeloma
SOX2	: SRY-Box Transkripsiyon Faktörü 2
STAT3	: Transkripsiyonun Sinyal Transdüseri ve Aktivatörü 3
TET	: On-On Bir Translokasyon Enzimi
TUG1	: Taurin Upregulated Gene 1
UCA1	: Ürotelyal Kanser İlişkili 1
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
VDBP	: Vitamin D Bağlayıcı Protein
VDJ	: Değişken-Çeşitlilik-Birleşme
VDR	: Vitamin D Reseptörü
VDRE	: Vitamin D Yanıt Elementi
VİT D	: Vitamin D
VLA 4/5	: Very Late Antigen-4/5
YOD1	: YOD1 Deubikitinaz
YY1	: Transkripsiyonel Baskılayıcı Protein YY1

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Vitamin D3'ün Multiple Myeloma Hücrelerinde Uzun Kodlayıcı Olmayan RNA (lncRNA) İfadesine Etkisinin İncelenmesi

Kübra Nur BOSTANCI

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ayşe KIZILYER

Haziran, 2024

Multiple myeloma (MM), anormal plazma hücrelerinin kemik iliğinde aşırı çoğalmasıyla gelişen hematolojik bir malignitedir. Hematolojik kanserlerin %10'unu oluşturan MM, genellikle 69 yaş ve üzeri bireylerde görülmektedir. MM hastalarına kombine ilaç terapisi ve uygun bireylerde kök hücre transplantasyonu uygulansa da, zamanla gelişen ilaç direnci sonucu hastalık nüksetmekte ve hastalar kaybedilmektedir. Bu nedenle hastalığın erken tanısı, önleyici tıp yaklaşımlarının geliştirilebilmesi ve karşılaşılan ilaç direncinin aşılması için hastalığın gelişiminde rolü olan moleküler mekanizmaların aydınlatılması son derece önemlidir. MM, hem genetik hem epigenetik düzensizliklerin sonucu ortaya çıkmaktadır. Epigenetik mekanizmanın bir parçası olan uzun kodlayıcı olmayan RNA (lncRNA)'ların anormal ifadesi, birçok patolojide ve MM'de sık rastlanan bir durumdur. Tümör baskılayıcı veya onkogenik karaktere sahip olabilen lncRNA'ların anormal ifadeleri, MM'de tümör gelişimini ve ilaç direncini teşvik etmektedir. lncRNA ifadesini düzenleyici rolü olduğu bilinen vitamin D, bir kemik iliği mikroçevresi elemanı olup, MM hastalarının %44'ünde yetersiz seviyededir. Promotör bölgesinde vitamin D yanıt dizileri (VDRE) bulunan lncRNA'ların transkripsiyonunu yönlendirebilen vitamin D'nin ortamda yeterli miktarda bulunmaması, lncRNA ifade düzensizliklerine yol açabilir. Bu bağlamda, bu tez çalışmasında insan MM hücre hattı olan NCI-H929 hücrelerine 24 ve 48 saat sürelerle tek başına veya proteazom inhibitörü carfilzomib ile birlikte uygulanan vitamin D'nin, MM'de farklı fonksiyonları olan hedef lncRNA (H19, NEAT1, MEG3, TUG1, UCA1) düzeylerine etkisi incelenmiştir. Bu çalışmanın bulgularına göre, vitamin D, lncRNA UCA1'in ifadesini artırırken, diğer lncRNA seviyelerinde önemli bir değişime yol açmamıştır. Vitamin D-carfilzomib kombine uygulaması ile yine UCA1 ifadesinde önemli bir artış tespit edilmiştir. Sonuç olarak, vitamin D, NCI-H929 hücrelerinde onkogenik lncRNA UCA1'in transkript seviyesini artırmaktadır. Bu etkinin mekanizması ve MM hücre işlevleri üzerindeki etkilerini inceleyen ek çalışmalar, vitamin D'nin MM hastalarında güvenle kullanılabilmesi için kritik öneme sahiptir.

Anahtar Kelimeler: H19, MEG3, NEAT1, TUG1, UCA1, Vitamin D

Hazırlanan bu Yüksek Lisans tezi Burdur MAKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0883-YL-23 No'lu proje ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Examination of the Effect of Vitamin D3 on Long Non-Coding RNA (LncRNA) Expression in Multiple Myeloma Cells

Kübra Nur BOSTANCI

**Burdur Mehmet Akif Ersoy University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics**

Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Ayşe KIZILYER

June, 2024

Multiple myeloma (MM) is a hematologic malignancy that develops due to the excessive proliferation of abnormal plasma cells in the bone marrow. MM, which constitutes 10% of hematological cancers, is generally seen in individuals aged 69 and above. Despite the administration of combined drug therapy and stem cell transplantation in eligible individuals, the development of drug resistance over time leads to disease relapse and patient mortality. Therefore, elucidating the molecular mechanisms involved in the development of MM is of utmost importance for early diagnosis, the development of preventive medical approaches, and overcoming drug resistance. MM arises as a result of both genetic and epigenetic abnormalities. Abnormal expression of long non-coding RNAs (lncRNAs), which are part of the epigenetic mechanism, is frequently observed in MM and in many other pathologies. Abnormal expression of lncRNAs, which may have tumor suppressor or oncogenic characteristics, promotes tumor development and drug resistance in MM. Vitamin D, known for its regulatory role in lncRNA expression, is a bone marrow microenvironmental factor and is deficient in 44% of the MM patients. Insufficient amounts of vitamin D, which can direct the transcription of lncRNAs with vitamin D response sequences (VDRE) in their promoter, may lead to dysregulation in the lncRNA expression. In this context, this thesis investigates the effect of single, or combined use of vitamin D with a proteasome inhibitor, carfilzomib, for 24 and 48 hours, on the levels of target lncRNAs (H19, NEAT1, MEG3, TUG1, UCA1) in the human MM cell line NCI-H929. According to the findings of this study, vitamin D increases the expression of the lncRNA UCA1, while it does not cause significant changes in the levels of other lncRNAs. A significant increase in UCA1 expression was also detected with the combined application of vitamin D and carfilzomib. In conclusion, vitamin D increases the transcript levels of the oncogenic lncRNA UCA1 in NCI-H929 cells. Further studies investigating the mechanism of this effect and its impact on MM cell functions are crucial for ensuring the safe use of vitamin D in MM patients.

Keywords: H19, MEG3, NEAT1, TUG1, UCA1, Vitamin D

This Master's thesis was supported by Burdur MAKU Scientific Research Projects Coordination Office under project number 0883-YL-23.

1.GİRİŞ

Multiple myeloma (MM), transforme olmuş plazma hücresinin kemik iliğinde kontrolsüz çoğalması ve anormal seviyede monoklonal antikor üretmesiyle karakterize bir kan kanseri türüdür (Castañeda-Avila vd., 2024). MM'nin ortalama görülme yaşı 69 olup, yetişkin bireylerde en sık görülen ikinci hematolojik malignitedir (Cui vd., 2023). Kan kanseri türlerinin %10'unu oluşturan MM'nin, dünya çapında prevalansı ve insidansı yıldan yıla artmaktadır (Castañeda-Avila vd., 2024). Erkek bireylerin kadınlara oranla daha fazla tanı aldığı MM için; yaş, cinsiyet, ırk, genetik öykü ve pestisitlere, radyasyona maruziyet gibi çevresel etmenler hastalığın risk faktörleri arasındadır (Castañeda-Avila vd., 2024).

Aynı anda birden fazla organı etkilediği için "multiple myeloma" olarak adlandırılan bu kanser türünün meydana gelmesinde, kromozomal translokasyon, delesyon, duplikasyon gibi çeşitli genetik anomalilerin yanı sıra epigenetik mekanizmalardaki düzensizliklerin de rolü büyüktür (Díaz-Tejedor vd., 2021). Kombine ilaç uygulamaları ve uygun olan bireylerde kök hücre transplantasyonu ile MM'de 8-10 yıla kadar sağ kalım elde edilebilmesine rağmen ilaçlara direnç kazanan miyelom hücrelerinin yeniden çoğalmasıyla gelişen nüks sebebiyle MM'nin kalıcı ve etkili bir tedavisi henüz bulunamamıştır. MM gelişimine neden olan moleküler mekanizmaların açığa çıkarılması, hastalığın önlenmesi ve etkin tedavisinde son derece önemlidir (Forster vd., 2023).

Patofizyolojisi tam olarak bilinmeyen MM'nin, plazma hücresinin geçirdiği bir dizi mutasyonun birikiminden kaynakladığı düşünülmektedir (Dragomir vd., 2024). Normal plazma hücresi, MM hücresine dönüştükten sonra hayatta kalmak ve kontrolsüzce çoğalmak için kendi bünyesinde hem genetik hem de epigenetik mekanizmalarda birtakım düzenlemelerde bulunur (Caprio vd., 2020). Miyelom hücrelerinin ortaya çıkmasında rolü olan DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, kromatinin yeniden şekillenmesi ve kodlayıcı olmayan RNA'lar gibi epigenetik mekanizmalar araştırmaların odağı haline gelmesine rağmen etkileri halen açıklığa kavuşturulamamıştır.

İnsan genomunun yalnızca %2'lik kısmı proteine çevrilebilirken, geriye kalan %98'lik DNA dizilerinin son ürünü RNA olup, bu nedenle kodlayıcı olmayan RNA'lar olarak bilinmekte ve protein kodlayan genlerin ifadesini düzenlemektedir (Hauptman ve Glavač, 2013). Protein kodlamayan RNA genlerinin ifadelerindeki düzensizlikler, kanser başta olmak üzere pek çok hastalığın gelişimiyle ilişkilendirilmiştir (Lin ve He, 2017).

Kodlayıcı olmayan RNA'lar arasında uzunlukları 200 nükleotitten fazla olan ve bolca tekrar dizileri içeren uzun kodlayıcı olmayan RNA (long noncoding RNA veya lncRNA)'lar ilk defa 1980'lerin ortalarında tanımlanmış olup, halen yeni bireylerinin dizileri ve işlevleri tanımlanmaya devam etmektedir (Ma vd., 2013). DNA, RNA ve proteinler gibi geniş bir moleköl yelpazesıyla etkileşebilen lncRNA'lar, aşırı ifade olmaları veya baskılanmaları durumunda kanser dâhil çeşitli patolojilere zemin hazırlamaktadır (Ferrer ve Dimitrova, 2024). Genel olarak miRNA'ları baskılama görevini üstlenen lncRNA'lar diğer genlere oranla daha fazla transkript varyantı içermektedir (Belete vd., 2024). İlk keşfedilen lncRNA olan H19, MM'de aşırı ifade olarak *p53* genini baskılamakta ve hücreyi metastaza teşvik etmektedir (Rojas vd., 2022). MM'de sıklıkla ifadesi artan H19, bromodomain içeren protein 4 (BRD4)'ü hedef alan mir-152-3p ile bağlanarak, BRD4'ün mRNA ve protein ifadesini artırmakta ve bu sayede çoğalma avantajı kazanan MM hücreleri kemikte birikerek hasara neden olmaktadır (Zheng vd., 2020). Tümör baskılayıcı bir lncRNA olan MEG3 (maternally expressed gene 3)'ün ifadesi çoğu kanserde olduğu gibi MM'de de oldukça düşüktür. İnsan MM hücre modelinde MEG3 ifadesinin artırılması tümör gelişimini baskımlarken, MM nişindeki mezenşimal hücrelerde ise osteogenik farklılaşmayı ve böylelikle kemik homeostazının geri kazanılmasını sağlamaktadır (Sun vd., 2020).

MM'de ifadesi artan NEAT1 (nuclear enriched abundant transcript 1) kanserleşme sürecindeki hücre büyümesi, hücre invazyonu, migrasyonu gibi olayları destekler (Chen vd., 2023). Transkripsiyonu düzenleyici proteinlerin çekirdeğe iletilmesinde görev alan TUG1 (taurine-upregulated gene 1) diğer onkogenik lncRNA'lar gibi kanser hücrelerinde aşırı ifade edilmektedir. MM'de de aşırı ifade olan TUG1, myelom hücrelerinin invazyonunu destekler ve ilaç direncinin gelişmesine yardımcı olur (Lu vd., 2021). MM'de ifadesi düzensiz olan başka bir lncRNA UCA1 (urothelial carcinoma associated 1), MM hastalarında normal bireylere kıyasla ifadesi azalan ancak yüksek UCA1 ifadesine sahip bireylerde ise ilaç direnci ve kötü prognoz ile ilişkilendirilen bir lncRNA'dır (Hosseini vd., 2021). Kanser hücrelerinde kemoterapötik ajanlara direncin ortaya çıkması MM tedavisinde yaşanan en büyük zorluklardan biridir (Davis ve Sherbenou, 2021). Kanser hücresinin geliştirdiği direnç mekanizmaları çeşitlilik göstermekte olup, genel olarak genetik veya epigenetik anomaliler sebebiyle DNA tamiri, hücre bölünmesi, canlılığı, apoptozu ve ilaç metabolizmasında önemli proteinlerin ifade düzensizlikleri ya da işlev bozukluklarını içermektedir. Bu düzensizlikler sadece kanser hücresini değil nişini de etkilemektedir. Örneğin; myelom hücreleri kemik iliği

mikroçevresindeki hücresel ve ekstras l ler matriks elemanlarıyla adezyonunu artırarak adezyon-ilişkili dirence veya ortamda serbest formdaki parakrin, otokrin veya endokrin faktörlerin etkisiyle       r faktör-aracılı dirence sahip olabilir. Bu sayede myelom hücreleri, kemoterapötik ilaçlar kombine şekilde uygulanmasına hayatta kalmayı sürdürebilir ve invazyonunu ve migrasyonunu artırabilir (Garcia-Ortiz vd., 2021). Kemik iliği mikroçevresindeki       r faktörlerden biri olan vitamin D, MM hastalarının %44' nde normalden d    k seviyededir (Kondratyeva vd., 2020). Vitamin D, hem MM hem de kemik iliği stromal hücrelerinde epigenetik ve genetik süreçleri etkileyebilir; hücrelerin büyüme, bölünme, farklılaşma ve sa  kalım tercihlerini yönetebilir. Vitamin D, kanser hücrelerinin bağışıklık sisteminden kaçma yeteneklerini azaltarak ve ni teki inflamatuvar süreçleri düzenleyerek ilaç direnç mekanizmalarını etkileyebilir.

MM prognozu ile vitamin D eksikliği arasındaki ilişki pek çok araştırmaya konu olsa da henüz kesin bir kanıya varılamamıştır. * n vitro* hücre modelleriyle yapılan çalışmalar vitamin D/VDR yolağının hücre bölünmesini baskıladığını ve apoptozu uyardığını göstermiştir. MM hücrelerinde vitamin D-aracılı gelişen bu hücresel yanıtta epigenetik mekanizmanın katkısına dair kısıtlı miktarda veri bulunmaktadır. Vitamin D'nin MM hücresinde ifadesi d zensizle en hedef lncRNA'ların transkripsiyonel aktivitesini nasıl etkilediği sorusuna yanıt vermek amacıyla tasarlanan bu tez çalışmasında, vitamin D'nin tek başına ve kemoterapi ajanıyla birlikte uygulandığı kültür koşullarında, hücrelerin sa  kalım yanıtı ve bu yanıtla e  zamanlı olarak 5 farklı lncRNA geninin transkripsiyonel aktivitesindeki değişim incelenmiştir. Bu amaçla 24 ve 48 saatlik vitamin D dozlarının tek başına veya carfilzomib ile kombine uygulandığı MM hücrelerinden kantitatif reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu ile lncRNA transkript seviyeleri analiz edilmiştir.

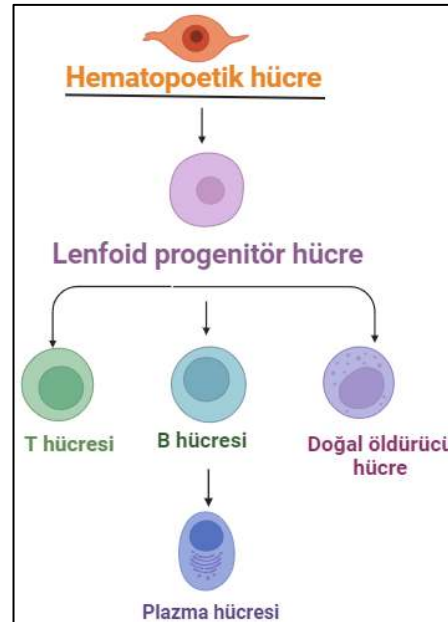
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Multiple Myeloma

Multiple myeloma (MM), anormal plazma hücrelerinin kemik iliğinde aşırı çoğalması ve M proteini (immünoglobulin M) olarak bilinen anormal antikor yapılarını toksik miktarda üretmesiyle tanımlanan hematolojik bir malignitedir (Rajkumar ve Kumar, 2016). B hücresinin gelişim sürecinde geçirdiği genetik ve epigenetik değişimler hastalığın ortaya çıkışında rol oynamaktadır.

2.1.1. B Hücresinin Kökeni

Yoğun çekirdeğini saran dar bir sitoplazmaya sahip olan B lenfositleri, 10 µm'den küçük bağışıklık hücreleridir. B hücresinin temel görevi membrana bağlı ve serbest formda immünoglobulinleri (Ig) aracılığıyla vücudu patojenlerin antijenlerine karşı korumaktır (Morris ve Edwards, 2019). Ortaya çıkışı ve gelişimi kemik iliğinde gerçekleşen B hücreleri, hematopoietik kök hücrelerden köken alırlar. Hematopoietik kök hücreler, miyeloid ve lenfoid olmak üzere iki tip progenitörü oluşturur (Şekil 2.1). Lenfoid progenitörlerden köken alan B hücreleri, kemik iliğinde çok aşamalı bir gelişim sürecine sahiptir (Barwick vd., 2019).



Şekil 2.1. B hücresinin kökeni. Hematopoietik kök hücreden gelişen lenfoid progenitör hücreleri, farklılaşarak B ve T lenfositleri ile doğal öldürücü hücreleri oluşturur. B hücreleri farklılaşarak plazma hücrelerine dönüşür.

2.1.2. B Hücresinin Olgunlaşma Süreci

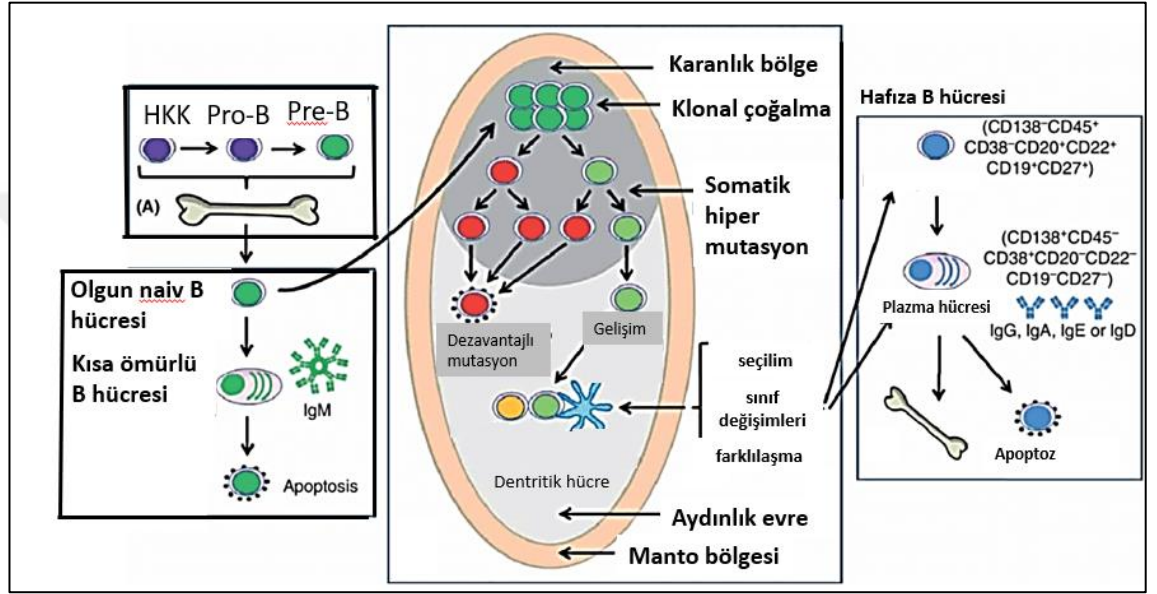
Lenfoid progenitörlerden B hücresi olmaya kararlanmış öncül hücreler çoğalıp farklılaşarak pro-B hücrelerini meydana getirir (Şekil 2.2). Bundan sonraki aşamalarda immünoglobulinler kademeli olarak sentezlenip hücre yüzeyinde sergilenmeye başlar. Pro-B hücrelerinde ilk olarak IgM ağır zincirine ait değişken (variable, V), çeşitlilik (diversity, D), kaynaşma (joining, J) dizileri RAG1 ve RAG2 (rekombinasyon aktive edici gen 1 ve 2) proteinleri tarafından rekombine edilir (Hardy ve Hayakawa, 2001; Pieper vd., 2013). Bu V-D-J segmentlerinin bir araya gelmesiyle Pro-B hücreleri, yüzeyinde IgM ağır zinciri ifadesine sahip pre-B hücrelerine dönüşür (Barwick vd., 2019).

Pre-B hücrelerinde, ağır zincir ifadesini takiben kappa (κ) hafif zincirinde VDJ rekombinasyonu meydana gelir. Üretken bir alel bulunamaması durumunda lambda (λ) hafif zincirinden VDJ rekombinasyonu ile hafif zincir sentezlenir (Schreiner vd., 2024). Hücre yüzeyinde, eşleştirilmiş ağır ve hafif zincirlerden oluşan B hücresi reseptörüne (BCR) sahip olgunlaşmamış B hücreleri, bundan sonra kemokin sinyallerini takip ederek kemik iliğinden ikincil lenfoid dokulara göç eder (Isnard vd., 2023). B hücreleri, lenf düğümlerinde korteks (kabuk) ve medulla (öz) olarak isimlendirilen iki bölgeden kortekste birikmeye başlar. Herhangi bir patojen varlığında, patojenik antijene en uyumlu reseptöre sahip B hücresi seçilir (Grigaite vd., 2023). Seçilen B hücresi antijene olan özgülüğünün artması ve farklı efektör hücreleri uyarabilecek antikör tiplerini üretilmesi için bir dizi genetik ve epigenetik değişime uğrar.

Germinal merkez (Şekil 2.2) olayları olarak adlandırılan bu süreçte B hücreleri, somatik hipermutasyon (SHM) ve sınıf değiştirme rekombinasyonu (class switch recombination, CSR) olarak adlandırılan iki tip değişim geçirir (Rivera vd., 2023). Germinal merkezdeki SHM ve CSR olaylarının her ikisi de aktivasyon ile uyarılmış sitidin deaminaz (AID) enzimi aracılığıyla gerçekleşir. AID enzimi, tek sarmallı DNA üzerindeki sitozinleri deamine ederek immünoglobulin ağır ve hafif zincirlerinin değişken bölgelerinde veya ağır zincire ait sabit bölge dizilerinde mutasyonlar oluşturur (Bruzeau vd., 2023).

Ağır ve hafif zincirlerin SHM'si tamamlayıcılık belirleyici bölge (complementarity-determining region, CDR)'nin mutasyonu yoluyla antikör-antijen afinitesini artırma potansiyeline sahiptir. SHM'yi yüksek afiniteli antikörlere sahip B hücresi klonlarının seçilimi takip eder. CSR, immünoglobulin ağır zincir dizilerinden μ sabit bölgesini ve bunun ek izoformu delta (δ)'yı, alternatif sabit bölgelerden gamma (γ)1,

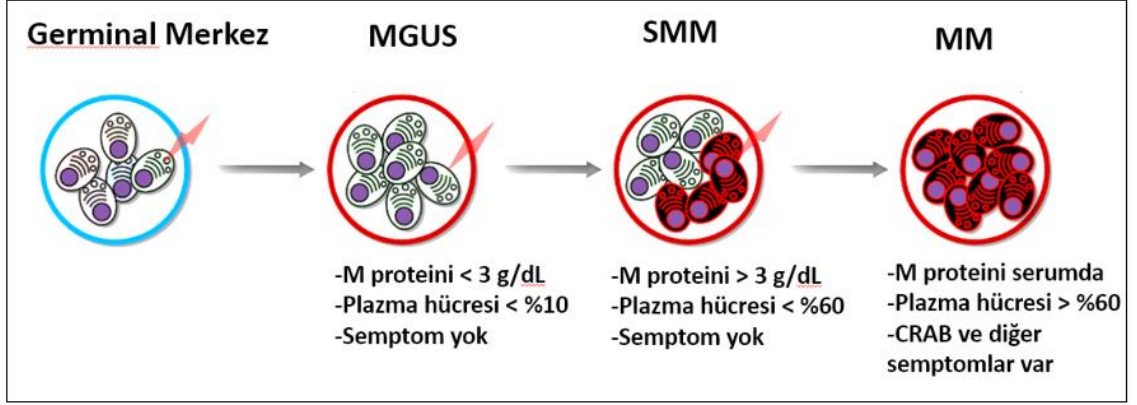
$\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$, alfa (α)1, $\alpha 2$, veya epsilon (ϵ) ile rekombine eder (Ridani vd., 2024). CSR olayında rol oynayan AID enzimi, her sabit bölgenin 5' kısmında yer alan ve yaklaşık 5 nükleotitlik dizilerin çoklu tekrarlarını içeren değişim (switch) bölgelerini hedef alır. AID tarafından meydana getirilen nükleotit değişimleri IgH sabit bölgesinde DNA çift sarmal kırılmalarına ve translokasyonlara neden olabilir (Grants vd., 2024). CSR'deki bu mutasyonların birikmesinin MM'yi başlatan değişikliklerin de kaynağı olduğu düşünülmektedir.



Şekil 2.2. B hücre farklılaşması

Transforme olmuş plazma hücreleri daha sonra kemotaktik faktörlerin yönlendirmesiyle kemik iliğine göç eder. Kemik iliği ortamında ek mutasyonların da birikimiyle hastalığın pre-malign evre olarak bilinen MGUS (monoklonal gamopati) ve SMM (smoldering multiple myeloma) evrelerine ve daha sonra malign MM evresine geçiş yaptığı kabul edilmektedir (Şekil 2.3).

Monoklonal gamopati olarak adlandırılan ve ileri yaş gruplarında en sık rastlanılan MGUS evresinde, kemik iliğinde çoğalan tek tip plazma hücrelerinin yoğunluğu %10'un altındadır (Şekil 2.3). Herhangi bir semptomun görülmediği bu aşamada, serumdaki M proteini miktarı 3 g/dL'den düşüktür. Plazma hücresi, genetik ve epigenetik temelli anomalilerin yığılmasıyla MGUS'tan SMM evresine geçer.



Şekil 2.3. MM'nin gelişim evreleri.

İkinci basamak olan SMM evresinde, monoklonal plazma hücrelerinin kemik iliğinde yoğunluğu %60'dan az olup, serumdaki M protein seviyesi 3 g/dL'nin üzerindedir. Herhangi bir semptomun görülmediği SMM evresinden MM evresine gelişim riski, MGUS'a oranla %13 daha fazladır (Becker, 2011). DNA onarım mekanizmasının hedef dışı mutasyonları baskılayamamasıyla hastalık MM evresine ilerler. MM evresinde kemik iliğini kaplayan tek tip plazma hücre yoğunluğu %60'ın da üzerinde olup, serumdaki M proteini miktarı %90'a ulaşmıştır. Bu evrede hastalarda belirli semptomlar görülmeye başlar (Ho vd., 2020).

2.2. MM Teşhis Kriterleri

MM tanısını yeni alan hastaların büyük çoğunluğunda yorgunluk, sık idrara çıkma, geçmeyen enfeksiyonlar, şiddetli kemik ağrıları gibi şikayetler görülmektedir. Bu şikayetlerle kliniğe gelen bireylerde MM'nin teşhisi için, Uluslararası Miyelom Çalışma Grubunun sunduğu kriterler baz alınmaktadır (Rajkumar vd., 2014). Bu kriterler arasında, CRAB (hiperCalsemia, Renal failure, Anemia, Bone disease) olarak kısaltılan kandaki kalsiyum seviyesinin yüksek olması durumu olan hiperkalsemi, kanda normalden düşük sayıda eritrosit varlığı olarak bilinen anemi, aşırı M proteinin böbrek tübüllerini tıkamasıyla gelişen böbrek yetmezliği ve kemik yapım-yıkım dengesinin kaybı sonucu ortaya çıkan kemik lezyonları bulunmaktadır (Ho vd., 2020). Kemikten alınan biyopsi örneğinin analizi ile teşhis süreci devam eder. Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı (National Comprehensive Cancer Network) kriterlerine göre, teşhisi yönlendiren kreatinin, elektrolit, albümin ve kalsiyum miktarının normalden fazla olması, trombosit ile tam kan sayımının yapılmasıyla hemoglobin seviyesinin 10 g/dL'nin altında saptanması, serum LDH (laktat dehidrogenaz) seviyesinin normalden yüksek bulunması ve beta-2 mikro

globulin miktarının aşırı düşük olması MM tanısını yönlendiren verilerdir (Michels ve Petersen, 2017). Serumda serbest hafif zincir (sFLC, serum free light chains) düzeylerinin ölçülmesi, pozitron emisyon tomografisi (PET), bilgisayarlı tomografi (CT) MM'nin teşhisi sırasında başvuru alan diğer analiz yöntemleridir. Ek olarak serumdaki kalsiyum miktarının 2,75 mmol/L'den yüksek olması ve Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) yöntemi ile t(4;14) ve t(11;14) başta olmak üzere immüoglobulin gen lokusunu içeren kromozom 14'ün translokasyonları, delesyon (del 13, 17p13), duplikasyon ve inversiyon gibi kromozomal anomalilerin varlığı MM tanısında bakılan önemli parametrelerdendir (Filippi vd., 2024).

2.3. MM'de Tedavi Yöntemleri

MM tedavisinde kemoterapi, radyoterapi ve otolog kök hücre nakli yöntemleri uygulanmaktadır. MM tedavisinde kullanılan en eski kemoterapötik ilaçlar glukokortikoid ve immünomodülatör sınıfına ait ilaçlardır. 1997 yılında, FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanan immünomodülatör ajan thalidomid tedavide kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonraki dönemlerde, 2006 yılında geliştirilen lenalidomid ve 2013 yılında geliştirilen pomalidomid özellikle nükseden hastalarda kullanılmıştır. Son yıllarda proteazom inhibitörleri (PI)'nin de geliştirilmesiyle MM tedavisinde ilerleme kaydedilmiştir. Birinci nesil bir PI olan bortezomib'e direnç gelişen hastalarda etkili olan ve bortezomibin aksine periferik nöropati ve kardiyak yan etkileri düşük olan carfilzomib, hücredeki proteostaz mekanizmasını etkileyen geri dönüşümsüz bir proteazom inhibitörüdür (Mao vd., 2024). Hastalara haftada bir veya iki kez intravenöz infüzyonla uygulanan carfilzomib, deksametazon ve lenalidomid ile kombine uygulanmaktadır. Aynı şekilde kombine uygulanan ve DNA iplikleri üzerinde replikasyon ve transkripsiyonu inhibe edici etkisi bulunan alkilleyici ajan siklofosfamid veya melfalan, histon deasetilaz inhibitörü olan panobinostat, oral yolla alınan üçüncü nesil proteazom inhibitörü olan ixazomib, MM tedavisinde kullanılan diğer ilaçlardır (Beksac vd., 2024). Farklı ilaç gruplarının birlikte kullanılmasıyla elde edilen tedavi başarısına rağmen hastalarda zamanla ilaç direnci gelişmektedir.

Kemoterapi ve radyoterapiye ek olarak, otolog kök hücre nakli de uzun süreli remisyon sağlamaya imkân sağlayan önemli bir tedavi yöntemidir. Yoğun kemoterapiyi takiben otolog kök hücre naklinin yapıldığı bu tedavi seçeneği, genellikle ileri yaş grubu MM hastalarında, MM dışında diğer sağlık problemlerinin varlığı nedeniyle her hastaya uygulanamamaktadır (Nau ve Lewis, 2008). Transfer aşamasında MM hücrelerinin

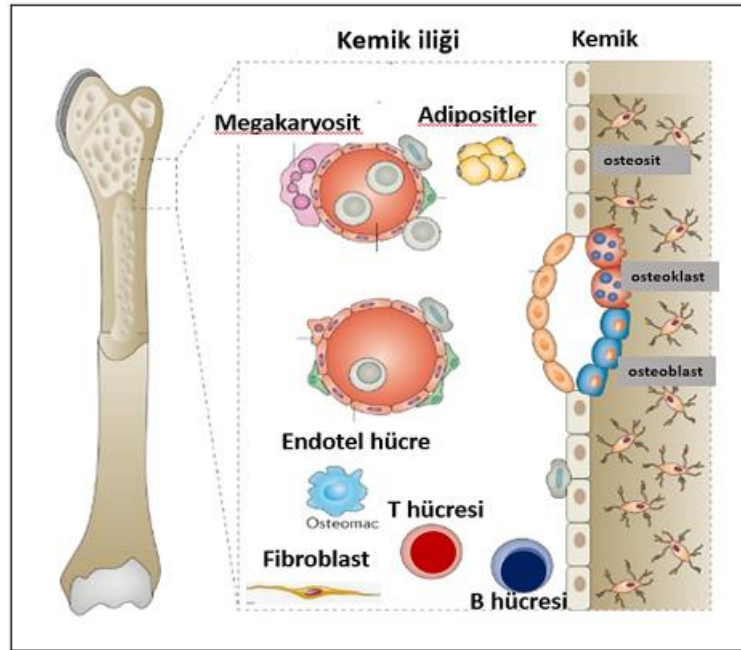
sağlıklı kemik iliği hücrelerinden ayrılamaması gibi riskler de bulunmakta olup, transfer sonrası hastalığın nüksü sıklıkla yaşanmaktadır (Yang ve Lin, 2015).

MM'ye yönelik etkin ve kalıcı tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi için, hastalığın oluşumu ve ilaç direncinin temelindeki moleküler mekanizmaların aydınlatılması son derece elzemdir.

MM oluşumu ve ilaç direncinin gelişiminde sadece kanser hücresinin değil kemik iliği mikroçevresindeki çözünür protein faktörlerin ve hücresel niş elemanlarıyla etkileşimlerin de rolü olduğu bilinmektedir.

2.4. Kemik İliği Mikroçevresi

Kemik iliği (Şekil 2.4.), hematopoietik ve mezenşimal kök hücreler, fibroblastlar, adipositler, osteoblastlar, osteoklastlar, endotel hücreleri, makrofajlar ve megakaryositler gibi farklı hücre popülasyonlarını barındıran kompleks bir ortamdır.



Şekil 2.4. Kemik iliği mikroçevresindeki hücre çeşitliliği (Aru vd., 2023).

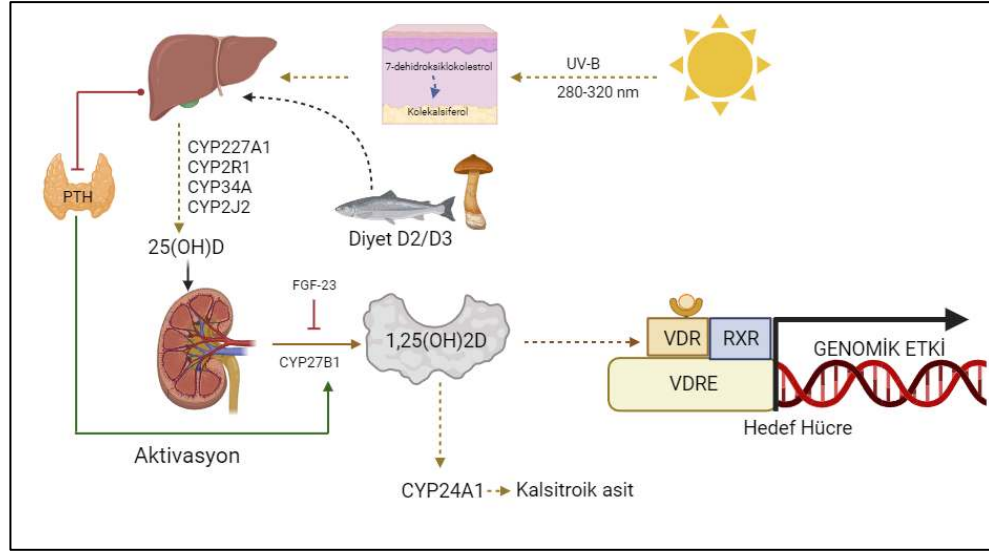
MM hücrelerinin kemik iliğindeki bu çevrede bulunması, diğer hücresel ve ekstraselüler elemanlarla doğrudan veya dolaylı etkileşimleri, MM hücresinin bölünme yeteneğini sürdürmesine, kan dolaşımına katılmasına ve hatta kemoterapötik ilaçlara karşı duyarsızlaşmasına katkıda bulunabilir. MM hücresi, kemik iliğindeki stromal hücrelerle doğrudan etkileşimleriyle PI3K/Akt (Phosphoinositide 3-kinase/Akt), NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) ve JAK2/STAT3 (Janus kinase-2/signal transducer and activator

of transcription 3) sinyal yolaklarını aktive ederek proliferasyonunu sürdürebilmektedir (Tang vd., 2018). MM hücrelerinin VLA-4/5 (very late antigen-4 veya 5) gibi adezyon molekülleri aracılığıyla kemik iliğindeki ekstraselüler matriks elemanlarına tutunması, hücre canlılığını artırmaktadır. Sürekli hayatta kalmak ve kontrolsüzce çoğalmak isteyen MM hücresi, salgıladığı faktörler ve hücre-hücre teması ile osteoklast aktivitesini artırırken, aksine osteoblast aktivitesini ve mezenşimal kök hücrelerden yeni osteoblast gelişimini baskılayarak litik kemik lezyonlarına zemin hazırlamaktadır (Andrews vd., 2013). İlaç tedavisindeki başarılarla rağmen, MM tedavisinde yaşanan en büyük problem kemoterapötik ilaçlara karşı gelişen dirençtir. İlaç etkilerinden kaçan MM hücreleri, birden farklı mekanizmayı kullanarak bu direnci geliştirebilmektedir. Direnç önceden gelişebileceği gibi, yeni oluşan genetik değişimler sonucunda, hücre adezyon moleküllerinin ifadesindeki anormal artış ile ortaya çıkan adezyon- aracılı direnç yoluyla ya da otokrin, parakrin veya endokrin etki gösteren çözünür faktörler aracılığıyla sonradan da ortaya çıkabilir (Furukawa ve Kikuchi, 2016).

Kemik iliğinin çözünür elemanlarından biri olan vitamin D, MM hücrelerinde ve kemik iliğindeki stromal hücrelerde ifade edilen VDR'ye bağlanarak bu hücrelerin işlevlerini ve birbiriyle etkileşimlerini düzenleyebilir (Pike vd., 2012). Hematopoietik hücreleri ve farklı kan hücrelerinin gelişimlerini etkileyebilen vitamin D, MM hücrelerinin büyümesini baskılayıcı ve apoptoza yönlendirici özellikleri ile anti-tümör etki göstermektedir. Fakat çoğu kanser türünde olduğu gibi MM'de de vitamin D'nin eksikliği sıkça görülmektedir (Graklanov vd., 2020).

2.5. Vitamin D Metabolizması

Vitamin D, %2 oranında diyetle alınabilen ancak %98 oranında UV-B güneş ışınlarının (280-320 nm) cildin epidermis tabakasında soğurulmasıyla 7-dehidrokolestrolden de sentezlenebilen steroid yapıda bir pre-hormondur (Christakos vd., 2012). Vitamin D, ergokalsiferol (vitamin D2) formunda ıspanak, portakal, muz gibi bitkisel kaynaklardan veya kolekalsiferol (vitamin D3) formunda yumurta sarısı, somon, morina balığı, süt ve süt ürünleri gibi hayvansal gıdalarla dışardan vücuda alınabilir. Ancak birincil üretim kaynağı her zaman güneş ışığı ile deride sentezlenmesidir (Benedik, 2021; Uwitonze vd., 2020). Vitamin D, aktif formuna dönüşebilmek için daha sonra iki farklı yerde hidroksile edilmektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Vitamin D'nin metabolizması (Kulda, 2012)

Vitamin D bağlayıcı protein (VDBP) ile kanda taşınan vitamin D, karaciğerde CYP27A1 ve diğer kataliz enzimlerinin katkılarıyla 25-hidroksikolekalsiferole (25(OH)D) dönüşür (Saponaro vd., 2020). Böbreğin proksimal tübüllerine iletilen 25(OH)D, CYP27B1 (25-hidroksivitamin D-1 α -hidroksilaz) enzimi tarafından hidroksile edilerek aktif vitamin D formu olan, 1,25 dihidroksi kolekalsiferole (1,25-dihidroksi vitamin D3) dönüştürülür (Bailey vd., 2007). Aktif formdaki vitamin D, hedef hücrede vitamin D reseptörü (VDR) ve retinoid X reseptörü (RXR) ile kompleks oluşturarak çekirdeğe transfer olur. Hedef genlerin DNA dizisindeki Vitamin D Yanıt Elementi (VDRE)'ne bağlanarak transkripsiyonu düzenleyici rol oynar. Vitamin D ile paratiroid (PTH) hormonu arasında kuvvetli bir geri bildirim mekanizması bulunmaktadır. PTH, böbrekte CYP27B1'in aktivitesini uyarırken, vitamin D ise PTH salınımını inhibe eder.

2.6. Vitamin D/VDR Aracılığıyla Düzenlenen İşlevler

Vitamin D reseptörü VDR, nükleer reseptör ailesinin bir üyesidir. Kromozom 12 q13.11 bölgesinden transkribe olan bu reseptör, vitamin D ile bağlanarak veya vitamin D'den bağımsız halde VDRE dizilerine bağlanarak çeşitli genlerin transkripsiyonunu etkilemektedir (Iriani vd., 2024). VDR, transkripsiyonel aktivatör veya inhibitörlerle etkileşerek gen ifadesini artırıcı veya baskılayıcı etki gösterebilir (Henry, 2011). Vitamin D'nin aktif formu 1,25(OH)2D3, VDR için en uyumlu liganddır. Vitamin D, kendi reseptörü olan VDR ile retinoid X reseptörünün (RXR) dimerleşmesini uyararak insan genomunun %3-5'lik kısmını doğrudan veya dolaylı olarak transkripsiyonel seviyede kontrol eder (Ramagopalan vd., 2010). Vitamin D'nin etki ettiği gen grupları arasında

epigenetik olaylarda kilit rol oynayan proteinler ve kodlayıcı olmayan RNA genleri de bulunmaktadır (Barajas Ordonez vd.). Ek olarak, VDR, vitamin D'den bağımsız olarak DNA'ya bağlanma veya sinyal proteinleri ile doğrudan etkileşime girme suretiyle de hücrel olayları yönetebilmektedir (Pike ve Meyer, 2014).

VDR/RXR kompleksi, vücutta bağırsaktan kalsiyumun emilimi, kemiğin mineralizasyonu, bağışıklık elemanlarının modülasyonu, fagositozun düzenlenmesi, süperoksit sentezinin aktivasyonu, keratinosit farklılaşması, ksenobiyotiklerin yıkımının düzenlenmesi gibi birçok hücrel olayı etkileyebilmektedir. Vitamin D'nin serum seviyesinin 50-100 ng/dL arasında olması ideal iken, 30 ng/dL'nin altında olması yetersizlik, 10 ng/mL'nin altında olması yoksunluk olarak tanımlanır (Binkley vd., 2010; Khan ve Fabian, 2010). Vitamin D'nin eksikliği kas ağrısı, halsizlik, yorgunluk, tende solgunluk, saç dökülmesi, kireçlenme gibi pek çok semptomun gelişmesine neden olmaktadır (Gunton ve Girgis, 2018). Bunun yanı sıra, vitamin D yoksunluğu kanser başta olmak üzere otoimmün, kemik ilişkili, fetal dönemi de kapsayan bir dizi hastalıkla ilişkilendirilmiştir (Ali ve Vaidya, 2007; Hewison, 2012). Vitamin D eksikliği veya VDR ifadesinin azalması gibi sebeplerle kanser hücrelerinde vitamin D tarafından düzenlenen hücrel fonksiyonların sekteye uğramasının, tümör baskılayıcı genlerin ifadesinin azalması ve onkogenik karakterdeki genlerin ifadesinin artması ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Bikle, 2021). Bu durum kanserli hücrelerin bölünme, çoğalma, farklılaşma ve göç etme kabiliyeti kazanmasına yardımcı olur (Binkley vd., 2010).

MM hastalarının çoğunda görülen vitamin D eksikliği diğer kanser türlerinde de sıklıkla rastlanan bir durum olup, vitamin D kemoterapötik ilaç tedavisinde en sık kullanılan takviyelerden biridir (Yin vd., 2010).

2.7. MM'de Epigenetik Faktörler

MM patogeneğinde genetik anomalilerin yanı sıra epigenetik anomalilerin de rol oynadığı bilinmektedir (Caprio vd., 2020). Epigenetik modifikasyonlar, DNA'yı metile veya demetile eden enzimler, DNA'nın paketlenmesinde görevli histonların modifikasyonlarını oluşturan (writers), okuyan (readers) ve uzaklaştıran (erasers) proteinler ve kodlayıcı olmayan RNA'lar tarafından gerçekleştirilmektedir.

MM'de anormal DNA metilasyonu sıklıkla rastlanılan bir olaydır ve bu durum hastalığın gelişim hızını etkilemektedir (Amodio vd., 2017). MM'de DNA metil transferaz 1 (DNMT1)'in ekspresyonu, normal plazma hücrelerine kıyasla daha yüksektir ve enzimin seviyesi hastalığın seyri boyunca artmaktadır (Yang vd., 2022). Bununla

birlikte MM, normal plazma hücrelerine kıyasla düşük DNMT3a ekspresyonuna sahiptir (Yang vd., 2022). Aktif DNA demetilasyon enzimlerinden TET1'in MM'de ifadesi saptanamazken, TET2 ve TET3'ün ise düşük seviyede ifade edildiği tespit edilmiştir (Trtkova vd., 2019). TET2'nin sıklıkla difüz büyük B hücre lenfomalarında mutasyona uğradığı, MM'de ise TET1'in mutant olmayıp epigenetik olarak baskılandığı bilinmektedir (Lio vd., 2019).

Histon modifikasyonlarının anormal kurulumu malign hücrelerde sık görülen bir durumdur. Yapılan araştırmalarda, hematopoietik hücrelerin gelişiminde ve B hücrelerinin farklılaşmasında önemli histon metiltransferaz, Polycomb Baskılayıcı Kompleksi 2 (PRC2)'nin katalitik alt ünitesi Enhancer Of Zeste Homolog 2 (EZH2), MM'ye ait tüm hücre hatlarında aşırı ifade edilmektedir (Das vd., 2022; Rinke vd., 2020). MM'de histon modifikasyonları aracılığıyla EZH2 ifadesinin arttığı ve bu durumun artmış hücre çoğalmasına neden olduğu bulunmuştur (Das vd., 2022; Rinke vd., 2020).

İnsan genomunun sadece %2'si proteinleri kodlayan dizilerden oluşurken, %98'lik büyük kısmı ise, gen ifadesinde en etkin düzenleyici role sahip ve önemli hücre fonksiyonları kontrol eden, kodlayıcı olmayan RNA (noncoding RNA, ncRNA) moleküllerini üretmektedir (Jiang ve Guo, 2020).

Kodlayıcı olmayan RNA'lar transkript boyutuna göre küçük ncRNA'lar (18-200 nt) ve uzun ncRNA'lar (>200 nt) olarak iki gruba ayrılır (Yang vd., 2023). En kapsamlı incelenen ncRNA grubu, introgenik veya intergenik DNA lokuslarından kodlanan ve transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu düzenledikleri bilinen küçük transkriptler (18-22 nt) olan mikroRNA (miRNA)'lardır (Chen vd., 2021). MM'de yaygın olarak ifadesi düzensizleşen miRNA'lar arasında miR-21, miR-17-92, miR-15a/16, miR-29 ve miR-34 aileleri yer alır (Gregorova vd., 2021). MGUS evresinden MM gelişimine kadar olan süreçte miRNA ifade düzensizlikleri tespit edilmiştir (Ho vd., 2020). MM'nin gelişiminde ve ilerlemesinde pek çok rolü bulunan diğer grup ise olgun RNA boyutları 200 nükleotitten fazla olan uzun kodlayıcı olmayan RNA (lncRNA)'lardır.

2.8. Uzun Kodlayıcı Olmayan RNA'lar

Sitoplazmada veya çekirdekte lokalize olabilen ve 200 nükleotitten uzun, protein kodlamayan RNA'lar, uzun kodlayıcı olmayan RNA (lncRNA, long non-coding RNA) olarak sınıflandırılmaktadır. İfadeleri kendilerine özgü promotör dizilerinden kontrol edilen ve bolca tekrar dizisi içeren lncRNA genleri, tıpkı mRNA'lar gibi RNA Polimeraz II tarafından transkribe edilir. miRNA'larda olduğu gibi ekzon kaynaştırma (splicing) ile

intronik dizilerin uzaklaştırıldığı olgun lncRNA'lar, 5'cap yapısına ve 3'poliadenile kuyruğuna sahiptir (Ghasemian vd., 2024). İfadeleri dokuya özgü gerçekleşen ve birden fazla transkript varyantına sahip olan lncRNA'lar, miRNA'ların aksine türler arasında düşük dizi homolojisi gösterirler (Kaur vd., 2024). lncRNA genleri bir genin ekzonik veya intronik dizilerinde yerleşik bulunabileceği gibi bir genin kodlayıcı dizisiyle aynı yönde veya ters yönde okuma dizisine sahip olabilir ya da genler arası bölgeden de kodlanabilirler (Louro vd., 2009). lncRNA'lar, genom kararlılığının korunması, genomik baskılama (imprinting), X kromozomunun inaktivasyonu, transkripsiyonel veya translasyonel seviyede gen ifadesinin düzenlenmesi gibi temel ve önemli işlevlere sahiptir (Ferrer ve Dimitrova, 2024; Kaur vd., 2024). Çok yönlü fonksiyonlara sahip olan lncRNA'ların ifadelerindeki düzensizlikler, başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıklarla yakından ilişkilendirilmiştir (Sanchez Calle vd., 2018). Hem onkogenik hem de tümör baskılayıcı rolleri olan lncRNA'ların düzensiz ifade olmaya başlaması, kanserli hücrenin çoğalmasını, invazyonunu, migrasyonunu, metastazını teşvik edebildiği gibi ilaç direncine de katkı sağlar (Ma vd., 2013). Yürütülen çalışmalarda, lncRNA'ların, çeşitli bağışıklık hücrelerinin gelişimini yönlendirmede ve bağışıklık hücresi aktivasyonunun ayırt edici özelliği olan dinamik transkripsiyonel değişimlerin kontrolünde önemli roller oynadığı bulunmuştur (Khan vd., 2021).

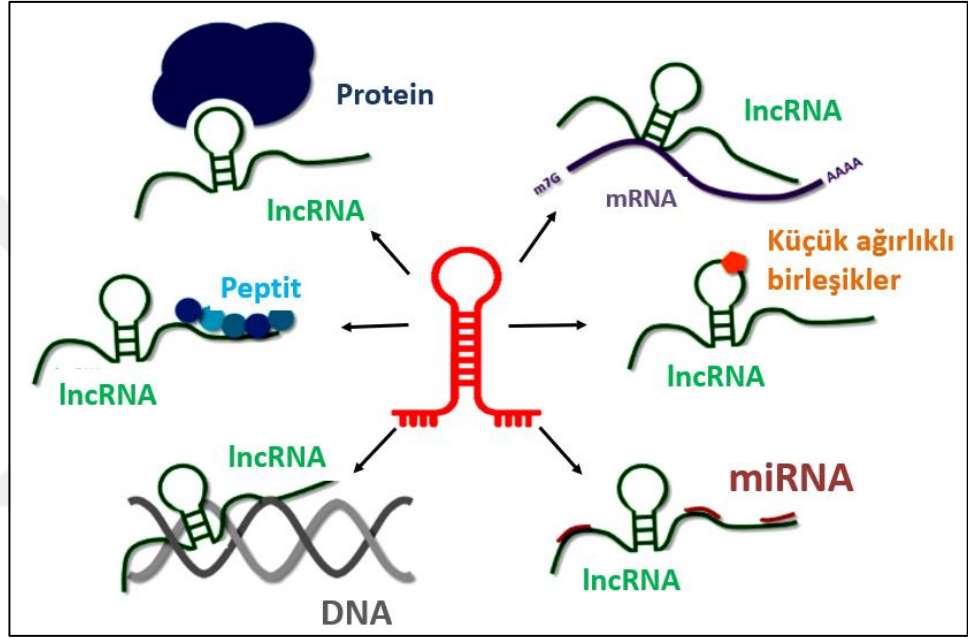
Hücredeki fonksiyonel etkileri son yıllarda anlaşılmaya başlanan lncRNA'lar, periferik kan veya dokudan tespit edilerek biyolojik belirteç gibi kullanılabilmektedir (Tao vd., 2024).

2.8.1. lncRNA'lar ile Etkileşimdeki Moleküller

lncRNA'lar DNA, RNA ve protein türdeki birden fazla molekülle etkileşimde bulunabilen, fonksiyonel çeşitliliğe sahip bir RNA grubudur (Şekil 2.6.). lncRNA'lar, DNA ile paralel veya anti-paralel üçlü sarmal yapılar oluşturarak ilgili dizinin transkripsiyonunu düzenleyici rol oynayabilirler. lncRNA MEG3'ün, adenin ve guanince zengin olan DNA bölgelerinde üçlü yapılar oluşturduğu bulunmuştur (Li vd., 2016). Bununla birlikte, birçok durumda, lncRNA'ların kendisi, proteinlerin aktivitesini, lokalizasyonunu düzenlemek ve farklı proteinlerin etkileşimlerinde birleştirici görevi görmek gibi, daha önce proteinlere has olduğu varsayılan anahtar düzenleyici rollere hizmet eder (Wilusz vd., 2009). Hücrede lncRNA'ların proteinlerle etkileşimi daha çeşitli olup, özellikle histonlara bağlanarak kromatin yapının yeniden şekillenmesine de katkı sağlayabilirler. İstisna olarak lncRNA'lar yaklaşık 100 nükleotitik küçük peptit dizilerini

üretebilen birkaç okuma çerçevesine sahip olabilirler (Han ve Chang, 2015). Bu ekspresyonlar zayıf olmakla birlikte hücredeki fonksiyonları tam olarak saptanamamıştır. lncRNA'lar en çok miRNA'larla etkileşime girer ve genellikle miRNA'ları dizi eşleşmesi ile üzerine bağlayan bir sünger görevi görerek miRNA seviyesini baskılamaktadırlar (Ferrer ve Dimitrova, 2024).

Zengin kimliğe sahip lncRNA'ların hedeflerinin kesin olarak belirlenmesi, ifadelerinin nasıl düzenlendiğinin ve ilişkili oldukları sinyal yollarının net şekilde aydınlatılması kanserin başını çektiği pek çok hastalığın perdesini aralayacaktır.



Şekil 2.6. lncRNA'nın etkileşimde bulunduğu moleküller. lncRNA'lar DNA ile doğrudan etkileşimde bulunabilir, proteinlerle birleşebilir, miRNA'yı süngerleyebilir, peptitlerle ve küçük ağırlığa sahip bileşiklerle sinerjistik ilişki kurabilirler (Kazimierczyk vd., 2020).

Bu tez çalışmasında MM'de daha önce onkogenik rolleri ile tanınan H19, NEAT1, TUG1 ve UCA1 ile tümör baskılayıcı role sahip MEG3 lncRNA'larının vitamin D etkisiyle ifadelerinin değişimi incelenecektir.

2.8.2. H19

H19, 1984 yılında Dr. Shirley Tilghman ve meslektaşları tarafından keşfedilen ilk lncRNA'dır (Hark ve Tilghman, 1998). Kromozomun 11p15.5 bölgesinde lokalize olan H19 geni, beş ekzon ve dört introna sahiptir. Imprinting sebebiyle sadece anneden gelen kopyadan ifade edilen ve 2.5 kb uzunluğunda bir transkriptte sahip olan H19, çoğunlukla

bulunmuştur (Guo vd., 2022). H19'un genel olarak, P53'ü baskılayarak genomik kararsızlığa neden olduğu düşünülmektedir (Y. Li vd., 2020). MM hücrelerinde H19'un yüksek ifadesi NF- κ B sinyal yolağını aktive ederek hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu destekleyen IL-6 ve IL-8 sitokinlerinin üretimini artırır (Sun vd., 2017). MM'de ifadesi artan insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve lncRNA H19 aynı kromozomal lokasyondan transkribe olan genlerdir. H19'un ifadesinin yüksek bulunduğu hücrelerde IGF-1'in de ifadesinin yüksek olduğu gözlenmiştir. IGF-1'in, PI3K/AKT sinyal yolunun aktive olmasını sağladığı ve miyelom hücrelerinin epitelden mezenkimal fenotipe geçişini hızlandırdığı tespit edilmiştir (Y. Peng vd., 2020). Farklı bir çalışma da ise H19 ile birlikte IGF-1'in ifade artışı hücre adezyon moleküllerinden SDF-1 ifadesinin artışına neden olarak MM hücrelerinin migrasyonunu teşvik ettiği belirlenmiştir (Rø vd., 2013).

MM hastalarında görülen tipik kemik lezyonlarının H19 ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. H19'un aşırı ifade edilmesi, PTEN/Akt/mTOR aracılığıyla MM'de kemik yapıcı hücreler olan osteoblastların ifadesini baskımlarken, kemik yıkıcı osteoklast hücrelerinin çoğalmasını destekleyerek kemik lezyonlarının oluşumuna katkı sağlar (Xia vd., 2024).

Literatürdeki veriler, vitamin D/VDR yolağı ve H19'un, kanserde önemli sinyal olaylarını zıt yönde etkilediğine işaret etmektedir. Yapılan araştırmalarda VDR'nin c-Myc/Mad-1 yolunu aktive ederek H19 ifadesini inhibe ettiği saptanmıştır (Darmadi vd., 2024). Kolon kanseri üzerine yapılan bir çalışmada, vitamin D'nin Notch sinyal ağının düzenlenmesi yoluyla H19 ifadesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Zichittella vd., 2023). Buna benzer şekilde, glioma hücrelerinde vitamin D'nin H19'un ilk ekzonundan kodlanan mir-675'i inhibe ettiği bildirilmiştir (Pan vd., 2020). VDR, H19 ve miR-675-5p arasında benzer bir geri bildirim döngüsü, diyabetik nefropatide de gözlemlenmiştir (Shaker vd., 2023). Ayrıca H19'un aşırı ifade olması veya vitamin D'nin eksikliği, genomik kararsızlığa neden olmakla birlikte metastatik yayılımı da teşvik etmektedir (Darmadi vd., 2024). H19'un bazı miRNA'ların ifadesini baskılayarak MM kanser hücresinin hayatta kalmasına destek olduğu bulunmuştur. Mir-193'ün H19 tarafından baskılanması, Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik bir üyesi olan Mcl-1'in transkripsiyonunu artırarak MM'de bortezomib direncini uyarmaktadır (Zeng vd., 2014). Farklı bir çalışma da ise vitamin D'nin VDR aracılığıyla mir-193'ü baskıladığı bulunmuştur (Wierzbicka vd., 2024). Buna ek olarak, H19, mir-152-3p ifadesini baskımlarken, vitamin D'nin ise mir-152-3p'yi aktive ettiği bildirilmiştir (Zheng vd., 2020). Aynı miRNA hedeflerinin

bulunması, H19 ile vitamin D/VDR yolağının ortak mekanizmaların düzenlenmesinde dolaylı etkileştiklerini göstermektedir. Ancak, vitamin D'nin H19 üzerindeki transkripsiyonel düzenleyici etkisi tam olarak belirlenememiştir.

2.8.3. MEG3

MEG3 (maternally expressed 3), 14q32 üzerinde kromozomal yerleşime sahip olan ve maternal alel tarafından ifade edilen yaklaşık 1.6 kb uzunluğunda bir gendir. lncRNA MEG3 ifadesinin pek çok kanser türünde baskılanması tümör baskılayıcı işleve sahip olduğuna işaret etmektedir (Lu vd., 2019). MEG3'ün, mir-181a/HOXA1 düzenleyici yoluyla MM hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozu uyardığı keşfedilmiştir (Shen vd., 2018). MM hastalarında MEG3 ifadesinin baskılanmasının hastalığın prognozunu olumsuz etkilediği tespit edilmiştir (Lu vd., 2019). MEG3'ün MM'de ilaç direncine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, MEG3 ifadesi artırılan RPMI-8226 hücrelerinde, bortezomibe duyarlılığın da arttığı gözlenmiştir (Zang vd., 2022). MEG3 ifadesinin kemik tümörleri, osteoporoz ve romatoid artrit gibi çeşitli kemik hastalıklarıyla ilişkili olduğu bulunmuştur (Xu vd., 2022). Yapılan çalışmalarda MM'de ifadesi artan SOX2 (SRY-Box Transcription Factor 2)'nin, BMP4 (Kemik Morfogenetik Proteini 4) promotörüne bağlanarak mezenkimal hücrelerden osteoblast gelişimini baskıladığı bilinmektedir. Buna karşın, MEG3'ün, SOX2'nin BMP4 promotörüyle etkileşimini engelleyerek osteogenik farklılaşmayı desteklediği bulunmuştur (Zhuang vd., 2015). MM hücrelerinin osteoblastik hücre oluşumunu baskılaması ve osteoklast aktivitesini uyarmasıyla gelişen litik kemik lezyonlarında, MEG3 ifadesinin baskılanmasının da rolü olduğu düşünülebilir.

Vitamin D ile MEG3 ifadesi arasındaki etkileşime dair kolorektal ve meme kanseri hücre hatları ile yapılmış çalışmalar mevcuttur. Bunlardan kolorektal kanserde de MEG3 ifadesinin baskılandığı ve vitamin D'nin VDR aracılığıyla MEG3'ü aktive ettiği bulunmuştur (Guoqin vd., 2021). Başka bir çalışmada vitamin D takviyesi sonrası hasta serumunda MEG3 ifadesinin arttığı saptanmıştır (Bintintan, 2018). Vitamin D/VDR kompleksi, kolorektal kanser hücrelerinde MEG3 ifadesini artırarak c-Myc'in ubiquitin-proteazom aracılığıyla yıkımını artırmış ve böylelikle hücrelerde glikoliz aktivitesini baskılamıştır (Zhang ve Gao, 2019). Buna karşın, VDR geninin baskılanması, kanser hücrelerinde MEG3 ifadesini azaltarak aerobik glikoliz inhibisyonunu ortadan kaldırmaktadır. Kolorektal kanser hastalarında görülen vitamin D eksikliği ve düşük MEG3 ifadesinin, düşük sağ kalım oranıyla ilişkili olabileceği saptanmıştır (Blasiak vd.,

2022). MEG3 ifadesinin 5-Azasitidin muamelesi sonrası artış göstermesi, kanserlerde azalan MEG3 ifadesinin promotör metilasyonu aracılı baskılanmanın sonucu olduğunu göstermektedir (Sellers vd., 2018). Bu durumu değerlendiren diğer araştırmacılar VDR'nin MEG3 promotörüne (-230, -243 bölgelerine) direkt bağlanarak MEG3 ifadesini düzenleyebileceğini göstermişlerdir (Zuo vd., 2020). Vitamin D varlığında, aktivitesi artan vitamin D-VDR kompleksi, MEG3 ifadesinde artışa neden olarak *p53*, *RB* ve *c-myc* gibi genlerin transkripsiyonunu uyarmaktadır. Bu durum kanserli hücrelerin proliferasyon yeteneğinin zayıflamasıyla sonuçlanmıştır (Zhang vd., 2022). MM'de genellikle serum seviyesi düşük olan vitamin D ve MEG3'ün etkileşimine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. MM hücrelerine yapılacak vitamin D uygulamasının, MEG3 ifadesini nasıl etkileyeceği sorusuna yanıt verecek olan bu tez çalışması bu yönüyle önem arz etmektedir.

2.8.4. NEAT1

NEAT1 (Nuclear Paraspeckle Assembly Transcript), gen dizisi kromozom 11q131 üzerinde konumlanmış, sitoplazmada da bulunabilen ama genellikle çekirdekte lokalize olan bir lncRNA'dır. NEAT1, çekirdekte nuclear paraspeckles (PSs) olarak adlandırılan ve RNA işlenmesi ile stres yanıtında görev alan yapının bir parçasıdır (Sellers vd., 2018). Özellikle embriyonik gelişim aşamasında önemi vurgulanan bu gen; NEAT-1 (3756 nk.) ve NEAT1-2 (22,743 nk.) olmak üzere iki transkript varyantına sahiptir (van Eyk, 2015). NEAT1 ifadesi, transkripsiyon faktörleri, DNA metilasyonu, miRNA'lar ve RNA-bağlayıcı proteinler aracılığıyla düzenlenmektedir. NEAT1 de miRNA'lar aracılığıyla gen ifadesini düzenleyebilmektedir (Saleh vd., 2024). Genellikle promotöründeki metilasyon kaybı sebebiyle artan NEAT1 ifadesi, tümörün başlangıcı ve ilerlemesinden sorumludur (Dong vd., 2018). Kanser türlerindeki sıklıkla düzensiz ifade olan NEAT1, metastazın gelişimi, nüks ve düşük sağkalım oranı gibi klinik özelliklerle ilişkilendirilmiştir (Park vd., 2021). Meme kanseri, kolorektal kanser, özofagus kanseri, yumurtalık kanseri, tiroid kanseri, rahim ağzı kanseri, glioma gibi kanser türlerinde ifadesinin yüksek olduğu tespit edildiği için, NEAT1 bir kanser biyolojik belirteci olarak da kullanılabilmektedir (Thankachan vd., 2021). NEAT1 ifade düzensizliği, kanser gelişimi süreçlerinden hücre göçü, hücre çoğalması ve farklılaşmasını etkilemektedir (Farzaneh vd., 2023). Difüz büyük B hücreli lenfomada aşırı ifade olan NEAT1, bir onkogen olan Gli-1 mRNA'sını hedef alan mir-34b-5p'yi baskılayarak, B hücrelerinin proliferasyonunu artırır (Bai vd., 2022). Hematolojik kanserlere kıyasla MM'de ifadesi önemli ölçüde yüksek olan NEAT1,

p53'ü baskılayarak DNA onarımından ve apoptozdan kaçış ile hücre döngüsünün devamı gibi çeşitli hücreyel olayları etkiler. Antisense diziyle NEAT1 ifadesinin baskılanması, MM hücrelerinin büyümesini baskılamakta ve apoptozu tetiklemektedir (Pan vd., 2019). NEAT1'nin ifadesinin baskılanması ile DNA tamirinde görevli genlerin de ifadesinde düşüş ve DNA hasarında artış gözlenmesi, NEAT1'in DNA tamiri mekanizmasıyla ilişkili olduğunu göstermiştir (Taiana vd., 2020). Artan NEAT1 ifadesi, kanser hücrelerinin kemoterapötik ilaçlara direnç geliştirmesinde de rol oynamaktadır. NEAT1'in baskılanması ile MM hücrelerinin melfalan, bortezomib ve carfilzomib'e duyarlılığı artmıştır (Taiana vd., 2020). NEAT1, c-Myc geni promotörüne doğrudan bağlanarak miyelom hücre apoptozunu inhibe eder (Qian vd., 2020).

2.8.5. TUG1

lncRNA TUG1,-22q12.2 üzerinde yerleşik 7.5 kb uzunluğunda bir gen olup, fare retinal hücrelerinde esansiyel bir aminoasit olan taurinle birlikte ifadesi arttığı için Taurine Upregulated Gene 1 (TUG1) olarak adlandırılmıştır. Fareyle insan arasında %77 oranında dizi benzerliği gösteren TUG1 geni, 4 ekzonik diziye sahiptir (Lewandowski vd., 2020). Olgun lncRNA TUG1, hem sitoplazmada hem de çekirdekte lokalize olabilmektedir (Lewandowski vd., 2020). lncRNA TUG1, glioma, üçlü negatif meme tümörü ve akciğer kanserinin özel bir grubunda azalırken, diğer birçok doku kanserlerinde yüksek seviyede ifade edilmektedir (Zhou vd., 2019). TUG1, çoğunlukla miRNA'ları baskılayarak ya da baskılayıcı histon modifikasyonlarını yapan PRC2'yi hedef bölgelere çekerek etkisini göstermektedir (Lin vd., 2016). lncRNA TUG1, hasar gören endotel hücrelerinde çoğalma, apoptoz ve otofaji gibi hücreyel olaylarla ilişkilendirilmiştir (Zhang vd., 2021). Yapılan çalışmalarda TUG1 ifadesinin yüksek olduğu mesane kanserinde TUG1'in baskılanmasıyla kanser hücrelerinin metastazının *in vivo* ve *in vitro* olarak baskılandığı bulunmuştur. Akut miyeloid lösemide TUG1 ifadesinin normal hücrelere kıyasla arttığı, buna karşın ifadesinin baskılanması ile hücre çoğalmasının azaldığı ve apoptozun arttığı belirlenmiştir (B. Zhang vd., 2020). B hücre maligniteleri ve MM'li hastaların serum örnekleriyle yapılan analizlerde, TUG1 ifadesinin normale kıyasla yüksek olduğu bulunmuştur (X. Zhang vd., 2020). TUG1, mir-145 ile negatif yönlü etki ederek miyelom hücrelerinin epitelyalden mezenkimale geçişini düzenlediği bildirilmiştir (Wu vd., 2024). TUG1'in vitamin D/VDR yolağıyla ilişkisine dair deneysel çalışmaya rastlanmamıştır. Vitamin D reseptörü VDR ile p53-aracılı etkileşimi olduğu düşünülen TUG1'in aşırı ifade olması ile VDR arasında negatif

korelasyon bulunmuştur (Mohan vd., 2020). Vitamin D eksikliği olan hastalarda TUG1 ifadesi genel olarak yüksek bulunmaktadır (Bikle, 2021).

2.8.6. UCA1

İlk kez insan mesane kanser hücre hattında tanımlanan ürotelyal karsinomla ilişki lncRNA (UCA1), kanser hücrelerinde ifade düzeyi yüksek olan ve malign hücre fenotipinin gelişmesine katkı sağlayan bir transkripttir. Kromozomal olarak 19p13.12'de konumlanan ve genellikle embriyonik dönemde ifadesi artan UCA1 geni, 1.4, 2.2 ve 2.7 kb uzunluğunda üç adet transkript varyantına sahiptir. Mesane, prostat, mide ve karaciğer kanserlerinde biyolojik belirteç olarak kullanılabilen UCA1, kemoterapi ajanlarına karşı direnç gelişiminde de rol oynayabilmektedir (Xuan vd., 2019). Mesane kanserli bireylerin idrar örneklerinden tespit edilebilen UCA1 ifadesi, hastalığın %67 oranında doğru teşhis edilmesini sağlamıştır. Kanseri teşvik edici özelliğiyle ön plana çıkan UCA1, tümör baskılayıcı miRNA'ları etkisiz hale getirerek bu sürece katkı sağlamaktadır. UCA1 hücrede Wnt/beta-katenin, PI3K/Akt gibi hücre bölünmesini uyaran çeşitli sinyal yollarını uyarak anormal hücre bölünmesini desteklemektedir (Liv d., 2020). Yapılan çalışmalar sonucunda insan mesane kanser hücre hattı BLS-211'de UCA1'in baskılanması ile hücrenin göçünün, invazyonunun ve ilaç direncinin azaldığı bulunmuştur (Ramli vd., 2021). UCA1 prostat kanser hücre hattında mir-204'ü baskılayarak bir histon deasetilaz olan Sirt1 ifadesini artırmakta ve docetaxele karşı direncin oluşmasına yol açmaktadır (Khalafizadeh vd., 2024). UCA1'in meme kanseri hücrelerinde baskılanması, hücre döngüsünü baskılamış ve apoptozu arttırmıştır (Tuo vd., 2015). Farklı bir çalışmada ise UCA1'in p27'yi inhibe ederek meme tümörünün gelişimine katkı sağladığı bulunmuştur (Xuan vd., 2019). Multiple myeloma'da aşırı ifade olan UCA1, hücrelerin IL-6'ya duyarlılığını artırarak hücre canlılığı ve çoğalmasını teşvik etmektedir (Li vd., 2019). Bunlara ek olarak UCA1, PI3K/Akt sinyal yolağını aracılığıyla hücrede tümör baskılayıcı gen olan p21'in ifadesini inhibe eder (Li vd., 2024). Literatürde UCA1'in vitamin D tarafından doğrudan etkilendiğine dair bir çalışmaya rastlanmamıştır. Fakat UCA1 ile vitamin D'nin ortak miRNA hedefleri bulunabilmektedir. Hastalarda sıklıkla görülen vitamin D eksikliği ve normalden fazla ifade olan UCA1 arasındaki ilişkiyi araştıran deneysel çalışmalar yeni bir moleküler ağı aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Alet ve Cihazlar

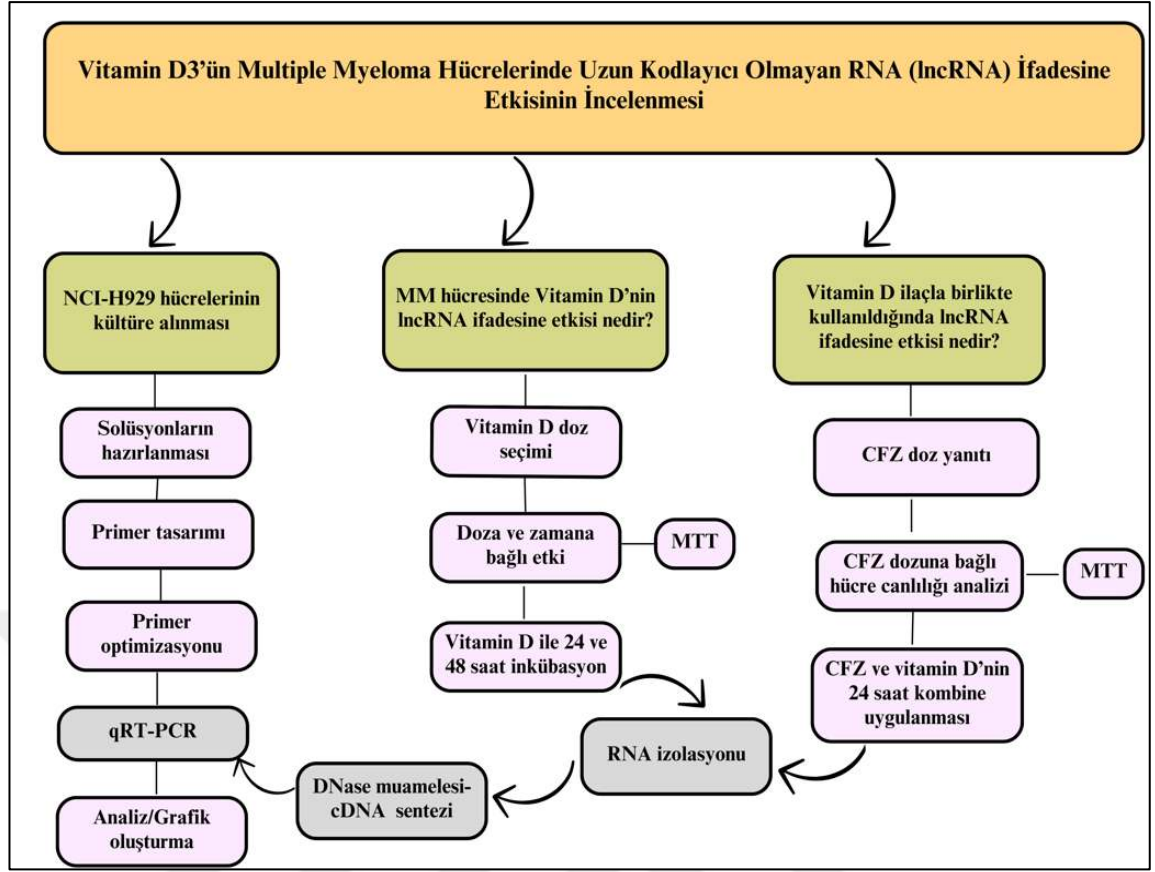
Çizelge 3.1. Deney sırasında kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları

Cihazlar	Marka ve Menşei	Kullanım Amacı
+4 °C Soğutucu	Regal (Türkiye)	Besiyeri ve diğer hassas kimyasalların muhafaza edilmesi
-20 °C Soğutucu	Grundig (Türkiye)	PCR vb. kitlerin aktivitesini kaybetmeden muhafaza edilmesi
-80 °C Soğutucu	Thermo Scientific (ABD)	Dondurulan hücrelerin muhafaza edilmesi
Inverted Mikroskop	Olympus (Japonya)	Hücre sayımı ve morfolojik gözlem
Sınıf-II Tip A biyogüvenlik kabini	DEMAIR (Türkiye)	Hücrelerle ilgili işlemlerin steril ortamda gerçekleştirilmesi
CO ₂ -li inkübatör	Thermo Scientific (ABD)	Hücreler için %5 CO ₂ ve 37 °C’de nemli atmosfer koşullarını sağlamak
Santrifüj	Hettich universal 320 (Almanya)	Hücrelerin çöktürülmesi
Mini vortex	Dlab (Çin)	Solüsyonları karıştırma
Manyetik Karıştırıcı	Dlab (Çin)	Çözelti hazırlama
PCR	LongGene A300	Gradyent PCR
PCR	NYXTechnik ATC-210 (Çin)	cDNA eldesi
CFX96 Connect Real-time PCR cihazı	Biorad (USA)	Kantitatif PCR reaksiyonu için
Epoch Mikro plaka Spektrofotometre	Agilent (USA)	Spektrofotometrik ölçümler için
Güç kaynağı	NYX Teknik	Jel elektroforezinin yürütülmesinde
Jel Görüntüleyici	Vilber Fusion Pulse (Fransa)	Ultraviyole jel görüntüleme
Hassas terazi	Dlab (Çin)	Kimyasalların tartımı
Otoklav	ALP -CLG (Japonya)	Laboratuvar malzemelerinin sterilizasyonu

3.2. Kimyasallar

Çizelge 3.2. Deney sırasında kullanılan sarflar ve kimyasallar

Sarf/Kimyasal Adı	Marka	Katalog No	Kullanım amacı
RPMI 1640	Gibco (ABD)	52400025	Hücrelerin beslenmesi ve pasajlanması
FBS	Gibco (ABD)	26140079	Besiyeri içeriğinin zenginleştirilmesi
Penisilin-Streptomisin	Thermo Scientific (ABD)	15140122	Besiyeri içeriğini bakteri üremesinden korumak
Vitamin D (1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3)	Sigma	D1530-10 UG	Vitamin D solüsyonu hazırlama
Carfilzomib	Cayman Chemical	17554	Carfilzomib solüsyonu hazırlama
Ecopure Total RNA kiti	Ecopure	E2075	Total RNA'nın izolasyonu
Dnase I	Thermo	EN0521	DNA kalıntılarının uzaklaştırması
Iscrip cDNA sentez kiti	BioRad	1708891	RNA'dan cDNA eldesi
SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix	BioRad	10000076382	PCR bileşeni
1 kb ladder	NEB	N3200S	PCR ürünlerinin boyutlarının değerlendirilmesi
SafeView Classic	ABM	G108	DNA bantlarının görünür hale getirilmesi
Tris base	Wisent Inc	600-127-EG	Solüsyon hazırlama
EDTA	Sigma	60-00-4	TAE tamponu hazırlama
Asetik asit	Sigma	64-19-7	TAE tamponu hazırlama
Agaroz	Biomax	HS-8000	Agaroz jel hazırlama



Şekil 3.1. Tez çalışmasının iş akışı. CFZ: carfilzomib

3.3. Hücre Kültürü Uygulamaları

3.3.1. Hücre Canlandırma ve Hücre Kültürü

Bu çalışmada kullanılan insan MM hücre hattı NCI-H929, Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC)'ndan daha önce satın alınmış ve sıvı azotta muhafaza edilmiştir. Hücrelerin kültüre alınmasında, içinde %10 fetal sığır serumu (FBS, ısı ile inaktive edilmiş), %1 Penisilin-Streptomisin (100 U/ml) antibiyotik solüsyonu içeren Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 besiyeri kullanıldı. Sıvı azottan hücrelerin canlandırılması işlemi, ilk olarak 15 ml falkon tüpü içerisine daha önce 37 °C'de ısıtılmış 13 ml taze tam besiyeri eklenerek başlatıldı. Hücreler 37 °C'deki su banyosunda çözdürüldükten sonra, besiyeri bulunan falkon tüpüne eklenerek 1200xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası dimetil sülfoksit (DMSO) içeren sıvı faz uzaklaştırılıp, hücreler taze besiyerinde süspanse edilerek santrifüj işlemi tekrar edildi. İkinci santrifüj işleminden sonra elde edilen hücre pelleti 4 ml tam besiyeri içinde süspanse edilerek 6-kuyucuklu plakaya pipetlendi. Hücreler 37 °C'de ve %5 CO₂ içeren nemli atmosferde inkübe edildi. Yirmi dört saat sonra inverted mikroskopta (Olympus, Japonya) 10X

objektif ile hücre morfolojisi ve yoğunluğu analiz edildi. Canlı hücre yoğunluğuna bağlı olarak NCI-H929 hücreleri T-25 kültür flaskına transfer edildi. Hücreler haftada iki kez pasajlanarak kültür devam ettirildi. Her deney için 24 saat öncesinden hücreler pasajlanarak ve/veya taze besiyeri eklenerek logaritmik fazda olmaları teşvik edildi.

3.3.2. Vitamin D Solüsyonunun Hazırlanması

Liyofilize formda temin edilen 10 µg vitamin D3 (Kalsitriol 1,25-dihidroxyvitamin D3), filtrasyon (0,22 µm naylon membran filtre) ile sterile edilmiş saf etanolde çözündürüldü. Son konsantrasyonu 100 µM olacak şekilde hazırlanan vitamin D, tek kullanımlık küçük hacimler halinde dışı alüminyum folyo ile kaplanmış tüplere bölündü. Hazırlanan tüpler -80 °C’de ısı ve ışıktan izole koşullarda muhafaza edildi.

3.3.3. Carfilzomib (CFZ) Solüsyonunun Hazırlanması

Liyofilize formdaki 5 mg carfilzomib (Çizelge 3.2.), filtre ile sterile edilmiş saf etanol içerisinde son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde çözündürüldü. Bu stoktan fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS, 1 X) ile seyreltme yapılarak 10 µM’lık carfilzomib çalışma çözeltisi hazırlandı. Çözelti tek kullanımlık hacimlere bölünerek, -80 °C’de ışıktan uzak şekilde muhafaza edildi.

3.4. MTT Analizi

Vitamin D ve carfilzomib’in deneylerde kullanılacak dozlarını belirlemek amacıyla, MTT analizi yapıldı. Metabolik aktiviteye dayalı canlı hücre tayininde kullanılan MTT testi, kültüre eklenen MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid) maddesinin hücrelerdeki aktif mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri tarafından parçalanmasıyla formazan kristallerinin oluşumuna dayanan hızlı kolorimetrik testtir. Bu kristallerin SDS (sodyum dodesil sülfat) veya DMSO içerisinde çözündürülmesi ile oluşan mor rengin şiddeti, canlı hücrelerdeki indirgeyici enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır.

MTT analizi için, 96-kuyucuklu plakanın her kuyusuna 99 µl tam besiyeri içerisinde 2×10^4 sayıda canlı hücre dağıtıldı. Uygun vitamin D veya CFZ dozunu içeren 1 µl hacim, 4 teknik tekrar halinde kuyucuklara eklendi. Besiyeride pH indikatörü olan fenol kırmızısının ve diğer besiyeri bileşenlerinin neden olduğu absorbansı elimine edebilmek için sadece besiyeri olan kontrol kuyuları hazırlandı. Vitamin D ve CFZ’nin çözücüsü olan etanolün tek başına canlı hücre sayısına etkisini belirlemek amacıyla en

yüksek vitamin D/CFZ dozundaki etanol yüzdesi (%0,05) taklit edilerek çözücü kontrol kuyuları oluşturuldu. 24-48 saat inkübasyonun ardından her kuyuya 10 µl MTT solüsyonu (5 mg/ml) eklendi. Formazan kristallerinin oluşumu için hücreler 37 °C’de, %5 CO₂ koşullarında 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin bitiminde, her bir kuyuya 0,01M HCl içinde hazırlanmış %10’luk SDS solüsyonundan 100 µl eklendi. Bir gece 37 °C’de inkübasyona bırakılan plakadan, ertesi gün Epoch plaka okuyucuda 570 nm ve 630 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Her bir kuyuya ait 570 nm absorbans değeri 630 nm absorbansından çıkarıldı. Daha sonra, sadece besiyeri olan koşulun absorbans değeri ortalaması diğer tüm kuyuların absorbans değerinden çıkarıldı. Elde edilen veriler sadece hücrelerin olduğu muamele edilmemiş kontrol grubuna göre normalize edilerek vitamin D/CFZ dozlarının hücre canlılığına etkisi belirlendi.

3.5. NCI-H929 Hücrelerine Vitamin D Uygulaması

Logaritmik fazdaki NCI-H929 hücreleri, 6-kuyucuklu plakaya kuyu başına 2 ml tam besiyeride 0.5×10^6 hücre olacak şekilde dağıtıldı. Serumsuz besiyeri ile seyreltilerek hazırlanan farklı vitamin D dozları kuyulara pipetlenerek, hücreler 24 ve 48 saat süreyle inkübe edildi. Kontrol olarak, muamele edilmemiş hücreler (0 nM) ve çözücü kontrolü olarak sadece etanol eklenmiş hücreler kullanıldı. Hücrelere eklenecek etanol miktarı için en yüksek alkol içeriğine sahip doza ait etanol miktarı temel alındı. İnkübasyon sonrası kuyulardan toplanan hücreler total RNA izolasyonunda kullanıldı.

3.6. NCI-H929 Hücrelerine Vitamin D ve Carfilzomibin Birlikte Uygulanması

Logaritmik fazdaki NCI-H299 hücreleri, 6-kuyucuklu plakaya her bir kuyuya 2 ml tam besiyeri içinde 1×10^6 hücre düşecek şekilde dağıtıldı. Daha önceden seçilen vitamin D dozu ile önceki lab çalışmalarımızda belirlenen CFZ’nin %50 inhibisyon dozuna göre 15 nM CFZ kuyulara eklenerek 24 saat inkübe edildi. Daha sonra kuyulardan toplanan hücrelerden total RNA izolasyonu yapıldı.

3.7. Total RNA İzolasyonu

Vitamin D ve/veya carfilzomib muamelesi gören NCI-H929 hücrelerinden total RNA izolasyonu için, inkübasyonu tamamlanan hücreler 6-kuyucuklu plakadan toplanarak 2 ml’lik santrifüj tüpüne aktarıldı. Toplanan hücreler 1200 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Oluşan hücre pelleti üzerine, hücreleri parçalamak için 400 µl lizis tamponu (Ecopure Total RNA Kiti) (Çizelge 3.2.) eklendi.

Pipetlenerek çözdürülen pellet, 10 saniye vortekslendikten sonra 400 µl %96'lık etanol ile karıştırıldı. Oluşan karışım tekrar temiz kolonun üzerine pipetlendikten sonra, kolon 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolonun altındaki atık tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, kolon üzerine 400 µl Yıkama Tamponu 1 eklendi. Santrifüj edilen kolona daha sonra 500 µl Yıkama Tamponu 2 eklendi. Aynı hızda 1 dk santrifüj edilen kolona 200 µl Yıkama Tamponu 2 eklenerek santrifüj işlemi tekrar edildi. Bu aşamada kolon, temiz bir 1,5 ml santrifüj tüpü içerisine yerleştirildi ve RNA'yı kolondan ayırmak amacıyla kolona 30 µl elüsyon tamponu eklendi. Bir dakika oda sıcaklığında inkübe edilen kolon 13000 rpm'de santrifüj edilerek, RNA örneğinin tüpün tabanına inmesi sağlandı. Kolondaki tüm RNA ürününü toplamak için, RNA içeren elüsyon çözeltisi kolona tekrar pipetlendi ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. Kolon maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen RNA örneğinin konsantrasyonu ve saflığı (260/280 nm) Epoch spektrofotometre cihazında analiz edildi. RNA örnekleri -80 °C'de muhafaza edildi.

3.8. cDNA Sentezi

Her bir örnekten alınan eşit miktarda RNA (200 ng), DNA kalıntılarından arındırmak amacıyla Çizelge 3.3'te belirtilen şekilde hazırlanan Dnase I içeren reaksiyon karışımı ile 37 °C'de 30 dk. muamele edildi. Daha sonra Dnase I'in inaktive edilmesi için, tüp içerisine 1 µl 50 mM EDTA solüsyonu eklenerek 65 °C'de 10 dakika inkübe edildi.

Çizelge 3.3. DNase I muamelesi

Reaksiyon Bileşenleri	Hacim (µl)
RNA örneği	X (200 ng)
Nuklease-free su	10'a tamamlanır
Buffer, 10 x	1
Dnase I enzimi (1 U/µL)	1
Total	10

DNase muamelesi tamamlanan örneklere ait tüplere, cDNA sentez kiti bileşenleri Çizelge 3.4'de belirtilen miktarlarda eklenerek RNA'ların cDNA'ya dönüştürülmeleri sağlandı.

Çizelge 3.4. cDNA sentez reaksiyonu karışımı

iScript cDNA sentez kiti bileşenleri	Hacim (µl)
Buffer, 5x	2
Reverse transkriptaz enzimi	0,5
DNase-RNase free su	2
RNA ürünü	5,5
Total hacim	10

Reaksiyon karışımlarının Çizelge 3.5'teki programa göre PCR cihazında inkübe edilmesi ile cDNA elde edildi ve reaksiyon ürünleri -20 °C'de muhafaza edildi.

Çizelge 3.5. cDNA sentez reaksiyonu koşulları

Reaksiyon Kademesi	Sıcaklık (°C)	Süre (Trtkova vd.)
Priming	25	5
Reverse transkripsiyon	46	20
Reverse Transkriptaz inaktivasyonu	95	1

3.9. PCR Primeri Tasarımı

Vitamin D uygulamasının hedef gen ifadesine etkisini belirlemek amacıyla H19, NEAT1, MEG3, UCA1, TUG1 ve referans gen olan GAPDH (Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz)'e ait forward ve reverse primer dizileri Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) programı kullanılarak tasarlandı. Her gene özgü transkript varyantları Clustal Omega programıyla (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) karşılaştırılarak, ortak olan diziler primer tasarımında kullanıldı. Tasarlanan primer çiftleri Oligoanalyzer uygulamasında (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) sekonder yapı (homodimer-heterodimer yapıları, saç tokası) oluşturma olasılıkları yönünden analiz edildikten sonra üretici firmaya (Oligomer, Ankara, Türkiye) sentez ettirildi. Sentezlenen primerlerden, nükleaz içermeyen su ile çözündürülerek 100 µM ana stoklar ve PCR reaksiyonlarında kullanılmak üzere 10 µM ara stoklar hazırlandı. Her iki stok çözelti de -20°C'de soğutucuda muhafaza edildi.

Çizelge 3.6. Hedef genlere özgü primer dizileri

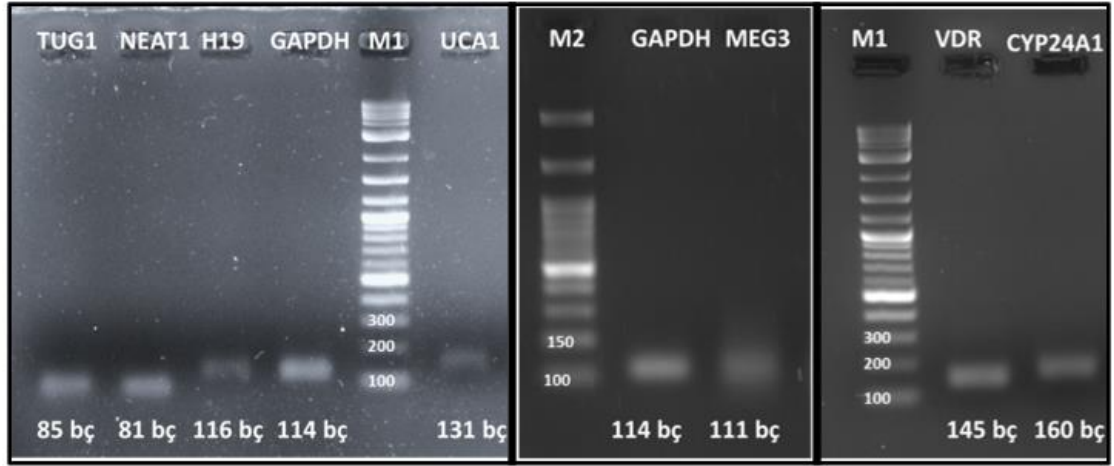
Gen adı	Primer dizisi (5'-3')	NCBI Erişim Numarası	Ürün boyutu (baz çifti)
H19	F: GACTCTGTTTCCCCCGTCC	NR_002196.3	116
	R: AAGGTGGCTCACACTCACG		
MEG3	F: ATGCTGAGCTGCTGCCAA	NR_002766.2	111
	R: ATCCTGGTCCTGGGGGTC		
NEAT1	F: CCACCTGTTTGCCTGCCT	NR_028272.1	81
	R: ACAGCTCTTCAACGCCCC		
TUG1	F: ACTGTGACCCAGGAGGCA	NM_00139651	85
	R: AGGGCTGTGCTGAATCTGG		
UCA1	F: GAGCCGATCAGACAAACAACC	NR_015379.3	131
	R: CAGAGGAACGGATGAAGCCT		
GAPDH	F: CACCATCTTCCACCAGCGAC	NM_001256799.3	114
	R: AAATGAGCCCCAGCCTTCTC		
VDR	F: GACCCTGGAGACTTTGACCG	NM_000376.3	145
	R: AGGTGAATAGTGCCTTCCGC		
CYP24A1	F: TTGGGTTCCTTTGAGTCGGT	NM_000782.5	160
	R: CTTCCCCTTCCAGGATCAGC		

3.10. Gradyent PCR ile Primerlerin Optimizasyonu

Primerlerin etkin çalışma sıcaklığını belirlemek için aynı reaksiyon karışımını içeren tüpler farklı primer bağlanma sıcaklıklarında inkübe edilerek gradyent PCR'a tabi tutuldu. Farklı sıcaklıklarda elde edilen PCR ürünleri, jel elektroforezi yapılarak bant boyutlarına ve şiddetine göre değerlendirildi.

3.11. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR ürünlerinin boyutunu ve miktarını analiz etmek amacıyla %2'lik agaroz jel kullanılarak elektroforez yapıldı. Jele yüklenen örnekler 80 voltta 35 dakika yürütülerek ayrıştırıldı. Vilber Fusion Pulse (Almanya) cihazı kullanılarak DNA bantları görüntülendi. Optimizasyon denemeleri sonucunda tüm primerlerin 60 °C'de etkin bağlanma ve uzama yapabildiği tespit edildiğinden bundan sonraki tüm PCR uygulamalarında bu sıcaklık değeri kullanıldı.



Şekil 3.2. PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. NCI-H929 hücrelerinden elde edilen cDNA'dan TUG1, NEAT1, H19, UCA1 ve MEG3 lncRNA genleri ile VDR, CYP24A1 ve GAPDH genlerine özgü primerlerle 60 °C bağlanma sıcaklığında elde edilen PCR ürünlerinin bant görünüşleri ve beklenen ürün boyutları şekilde gösterilmektedir. M1: DNA markerı (N3200S, NEB, Massachusetts, ABD), M2: DNA markerı (DM003-R500, GeneDirex Inc.)

3.12. Kantitatif Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Vitamin D ve CFZ'nin tekli veya kombine uygulandığı NCI-H929 hücrelerinden sentezlenen cDNA'lar ile hedef genlerin ifadesini analiz etmek üzere PCR reaksiyonları kuruldu. Reaksiyon karışımları Çizelge 3.7'de belirtildiği şekilde toplam 10 µl'lik hacimlerde hazırlandı.

Çizelge 3.7. PCR bileşenleri

Ssoadvanced Universal SYBR Green Supermix Bileşenleri	Hacim (µl)
DNase-RNase free su	4
Forward Primer, 10 µM	0,3-0,4
Reverse Primer, 10 µM	0,3-0,4
cDNA	0,5
Supermix, 2x	5
Total hacim	10

Hazırlanan reaksiyon karışımları CFX96 (Biorad, ABD) gerçek zamanlı PCR cihazında Çizelge 3.8.'deki döngü koşullarında inkübe edilerek, hedef gen cDNA'larının çoğaltılması sağlandı.

Çizelge 3.8. PCR programı

PCR basamakları	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Döngü sayısı
Başlangıç	95	30	1
Denatürasyon	95	10	40
Primer bağlanma-uzama	58-60	20	

3.13. İstatistiksel Analiz

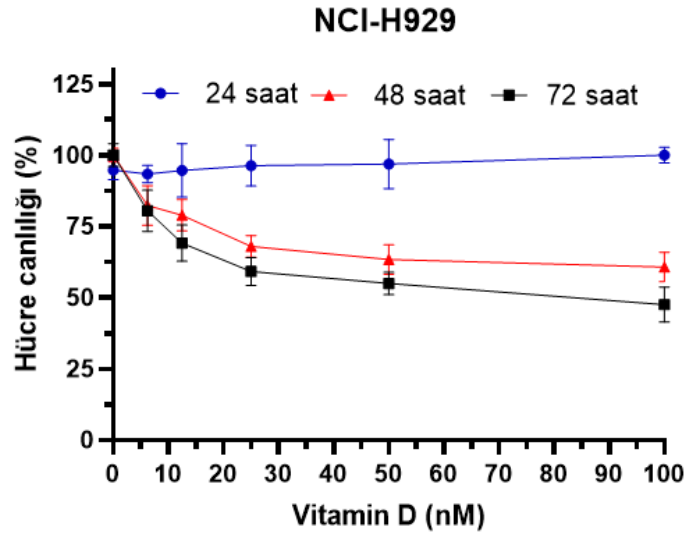
Genlerin ifade değişimlerinin değerlendirilmesi Livak metoduna göre yapılmıştır. Bunun için, her bir örneğin hedef gen için saptanan Ct (threshold cycle-eşik döngü) değerinden, referans gen olan GAPDH'in Ct değeri çıkarılarak delta Ct (dCt) değeri hesaplandı. Hiçbir uygulama yapılmayan örnek, kalibratör kabul edilerek 4 farklı deney setinden bu örneğe ait dCt değerlerinin ortalaması hesaplandı. Kalibratörün ortalama delta Ct değeri, hem kendinden hem de diğer örneklerin delta Ct değerinden çıkarılarak deltadelta Ct (ddCt) değeri elde edildi. ddCt değerlerinden 2^{-ddCt} formülü (Livak metodu) ile kontrole kıyasla gen ifadesindeki değişim hesaplandı. Sonuçlar Graphpad Prism 9.0 uygulamasında istatistiksel olarak analiz edildi. Normal dağılım yönünden değerlendirilen ölçümler, daha sonra one-way ANOVA testi ile analiz edildi. Birbirinden farklı olan gruplar Bonferroni testi ile belirlendi. İkili kıyas sonrası ortalamaları arasındaki farka ait p değeri 0,05'ten küçük olan gruplar, birbirinden önemli derecede farklı kabul edildi. Tüm analizlerde sonuçlar ortalama ve standart hata verisi olarak grafiğe dönüştürüldü.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Vitamin D'nin NCI-H929 Hücrelerinin Canlılığına Etkisi

Literatürde NCI-H929 hücreleriyle daha önceden yapılan çalışmalardan, aktif vitamin D veya analoglarının (EB1089) hücre döngüsünü baskıladığı ve apoptozu teşvik ettiği bilinmektedir (Giammanco vd., 2015; Korucu ve Unlu, 2022; Park vd., 2002; Park vd., 2000; Sari vd., 2020). Hücrelerin vitamin D etkisi altında canlılık oranlarındaki değişim MTT testi ile analiz edilerek bu çalışmada kullanılacak vitamin D dozları ve inkübasyon süreleri belirlenmiştir. Denenecek doz aralığı, literatür bilgileri ve vitamin D'nin fizyolojik dozları temel alınarak belirlenmiştir. Endokrin Derneği'ne göre normal kabul edilen fizyolojik vitamin D dozu 40-60 ng/mL olup, 150 ng/mL toksik doz olarak kabul edilmektedir (Abdel-Hady vd., 2019). Bu tez çalışmasında uygulanan minimum doz olan 6,25 nM vitamin D, 2,5 ng/mL'ye, maksimum doz olan 100 nM vitamin D ise 40 ng/mL'ye tekabül etmektedir. Bu açıdan çalışmamızda fizyolojik doza yakın değerler kullanılmıştır. Uygulanan doz aralığında hücre canlılığının üç farklı zamandaki (24-48-72 saat) değişimine bakılmıştır.

MTT testi sonuçlarına göre, 24 saat inkübe edilen NCI-H929 hücreleri, canlılığını %96 oranında korumuştur (Şekil 4.1.). Vitamin D ile inkübasyon süresi iki katına çıkarıldığında, en düşük doz olan 6,25 nM vitamin D ile canlı hücre oranı % 82,3'e, 12,5 nM vitamin D ile %78,9'a düşmüştür. Canlı hücre oranının artan dozlar olan 25 nM'de %67,9'a, 50 nM'de %63,4'e ve 100 nM'de %60,7'ye gerilediği görülmüştür. NCI-H929 hücrelerinin vitamin D ile 72 saat muamelesi sonrası sırasıyla 6,25 nM'de %80, 12,5 nM'de %70, 25 nM'de %60 oranında canlı hücre bulunurken, bu oranın 50 nM'de %54'e ve en yüksek doz olan 100 nM'de %53'e gerilediği belirlenmiştir.



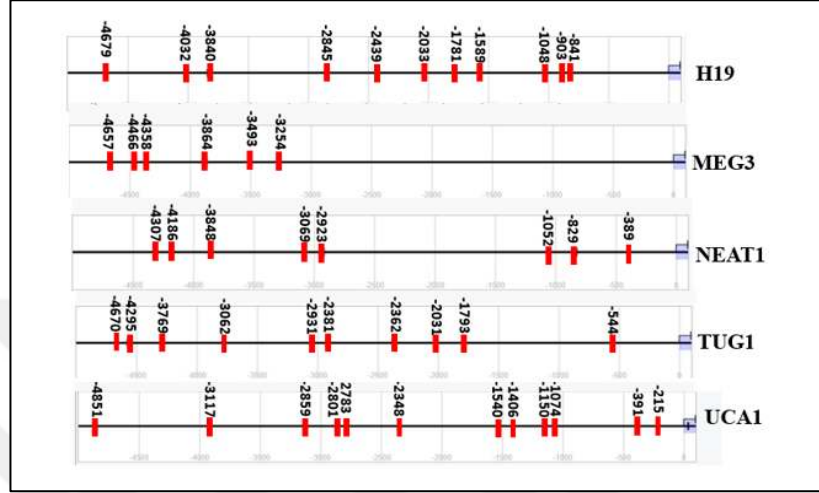
Şekil 4.1. Vitamin D uygulaması sonrası NCI-H929 hücre canlılığı grafiği. NCI-H929 hücrelerine 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM, 50 nM ve 100 nM vitamin D dozları 24, 48 ve 72 saat sürelerde uygulandıktan sonra MTT ile analiz edilen ortalama canlı hücre oranları grafikte gösterilmektedir. 48 ve 72 saatte canlı hücre oranında gözlenen değişimler istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,001$).

Bu sonuçlara göre, uygulanan dozlar 24 saatte canlı hücre sayısında önemli bir etki oluşturmazken, 48 saat ve 72 saat sonunda ise hücre canlılığında doza bağlı bir azalmaya neden olmaktadır. Her ne kadar 24 saat içinde canlı hücre popülasyonunda vitamin D'ye bağlı etkiler görünür olmasa da bu süre içinde vitamin D'nin transkripsiyonel etkileri tetiklenmektedir (Carlberg, 2022). Erken evrede başlayan transkripsiyonel değişimler hücre işlevlerinde önemli proteinlerin miktarında değişimlere yol açmakta ve böylelikle hücrenin sağ kalım, bölünme veya farklılaşma yanıtları geç evrede ortaya çıkmaktadır (Pike ve Meyer, 2014). Bu açıdan bundan sonraki deneylerde, canlı hücre oranının büyük oranda korunduğu 24 saat ve azalmaya başladığı 48 saat inkübasyon süreleri kullanılmıştır. Vitamin D'nin 50 nM ve 100 nM dozlarının üç farklı zamanda da hücre canlılığına etkisinin aynı olduğu saptandığından, 6,25 nM ile 50 nM arasındaki dozlar hücrelere uygulanmıştır.

4.2. Vitamin D'nin Transkripsiyonel Aktivesinin Tespiti

Vitamin D/VDR kompleksi çekirdeğe transfer olarak hedef gen promotörlerindeki VDRE dizilerine bağlanmak suretiyle gen ifadesini yönlendirmektedir. Ökaryotik promotör veri tabanı (EPD)'ndaki 5 hedef lncRNA'ya ait promotör dizilerinde

(transkripsiyon başlama bölgesinin 100 nükleotit aşağısı ve 5000 nükleotit yukarısı), JASPAR veri tabanında belirtilen VDRE motifi varlığı analiz edilmiştir (Şekil 4.2). Tarama sonucuna göre beş lncRNA'nın her birinde VDRE motiflerinin varlığı saptanmış olup, özellikle MEG3 için saptanan lokasyonlardan ikisinin VDR ile etkileştiği daha önceki bir çalışmada da deneysel olarak doğrulanmıştır (Zhu vd., 2018).



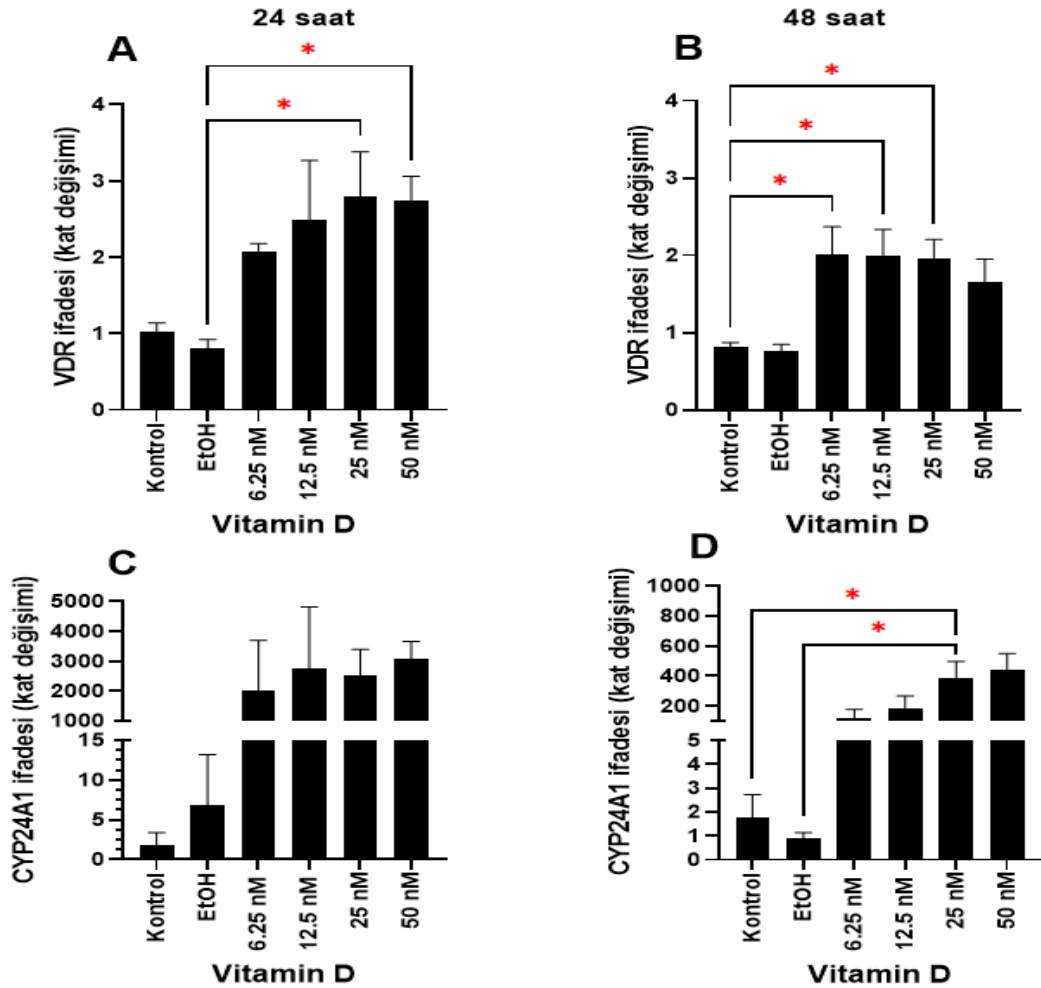
Şekil 4.2. Hedef lncRNA genlerinin promotör dizilerinde tanımlanan VDR yanıt elementlerinin konumu.

Vitamin D'nin hücre canlılığına etkisi belirlendikten sonra, NCI-H929 hücreleri seçilen dozlarda ve sürelerde vitamin D ile muamele edilmiştir. Vitamin D'nin transkripsiyonel aktivitesini doğrulamak amacıyla, ifadesinin VDR tarafından düzenlendiği bilinen iki hedef genin ifade değişim profilleri incelenmiştir. Bu hedef genlerden ilki, vücuttaki birçok hücrede ifade edilen ve vitamin D'nin kendi reseptörünü kodlayan VDR geni; diğeri ise mitokondri iç zarında görev yapan ve özellikle vitamin D'nin aktif formu olan 1,25-dihidroksivitamin D3'ü (kalsitriol) ve 25-hidroksivitamin D3'ü (kalsidiol) okside ederek inaktive eden CYP24A1 genidir.

Vitamin D'nin VDR ve CYP24A1 gen ifadesindeki etkileri, 24 ve 48 saatlik sürelerle incelenmiştir (Şekil 4.3). VDR ekspresyonu EtOH grubunda, her iki sürede de muamele edilmemiş kontrole kıyasla bazal seviyede kalırken, 24 saat vitamin D dozlarından (Şekil 4.3A) 6,25 nM ile yaklaşık 1,8 kat, 12,5 nM ile 3 kat, 25 nM ve 50 nM dozlarında ise 3,2 kat artış göstermiştir. 48 saatlik süre sonunda VDR ifadesi (Şekil 4.3B) 6,25 nM, 12,5 nM ve 25 nM vitamin D dozları ile 2,5 kat ve 50 nM dozunda ise yaklaşık 2 kat artmıştır. Kontrole kıyasla 24 saatte 12,5 nM, 25 nM ve 50 nM dozları ile; 48 saatte

6,25 nM, 12,5 nM ve 25 nM dozları ile gözlenen artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

CYP24A1'in, 24 saatlik sürede (Şekil 4.3C) kontrol grubunda ve EtOH ile muamele edilen hücrelerde ifadesi sıfır ya da tutarsız değerlerde iken, en düşük doz olan 6,25 nM vitamin D dozu ile yaklaşık 1105 kat arttığı gözlenmiştir. CYP24A1 ifadesi, artan vitamin D dozları olan 12,5 nM'de yaklaşık 1500 kat, 25 nM ile 1396 kat ve 50 nM dozunda yaklaşık 1665 kat artış göstermiştir. CYP24A1 ifadesi, muamele süresi 48 saat olan (Şekil 4.3D) EtOH grubunda, muamele görmemiş kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 1,9 kat azalırken, 6,25 nM vitamin D ile yaklaşık 67 kat, 12,5 nM dozunda 105 kat, 25 nM ile 223 kat ve 50 nM dozlarında ise 250 kat artmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı artışlar, EtOH ile karşılaştırıldığında 12,5 nM ve 25 nM vitamin D dozları için görülmüştür.



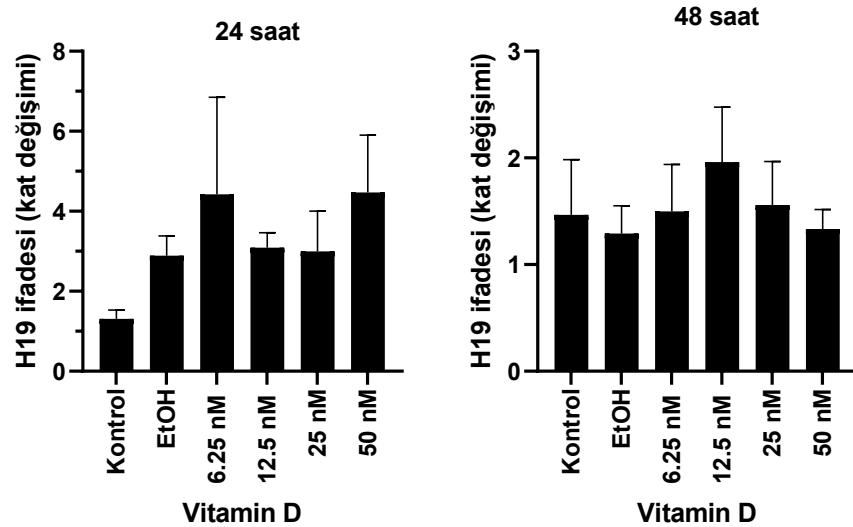
Şekil 4.3. NCI-H929 hücrelerinin Vitamin D ile 24, 48 saat muamelesi sonucu VDR ve CYP24A1 genlerinin ifade değişimi.

Tüm bu veriler kullanılan vitamin D'nin, VDR aracılı transkripsiyonu aktive edici etkilerinin, canlı hücre oranının değişmediği 24 saat zaman diliminde de kendini gösterebildiğini ve en düşük doz olan 6,25 nM ile bu etkinin uyarılabildiğini göstermektedir. Benzer etkilerin 48 saat sonra da devam ettiği ancak grupların kontrol grubuna göre gösterdiği kat değişimlerinin daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durum, kültüre eklenen vitamin D'nin artan CYP24A1 tarafından okside edilerek inaktive edilmesinden kaynaklanabilir. VDR ve CYP24A1 ifadelerinin 48 saatte kat artışlarında 24 saate oranla düşüş görülmesinin aksine, hücre canlılığındaki azalma 48-72 saatte daha belirgin hale gelmektedir. Bu da erken evrede gözlenen transkripsiyonel değişimlerin, ilerleyen süreçte hücre yanıtlarında rol oynayacak proteinleri etkileyerek hücresel süreçleri ve hayatta kalma mekanizmalarını modüle ettiğini düşündürmektedir.

4.3. Vitamin D Uygulamasının H19 Geni İfadesine Etkisi

24 saatlik vitamin D uygulaması sonrası lncRNA H19 ifadesi, kontrol grubuna kıyasla etanol ile 2,15 kat, 6,25 nM ve 50 nM vitamin D ile yaklaşık 3,4 kat, 12,5 nM ve 25 nM dozlarında ise 2,3 katlık artış göstermiştir (Şekil 4.4).

H19 ifadesi, 48 saat sonunda, kontrole kıyasla sadece 12,5 nM vitamin D dozunda 0,5 kat artarken, etanol ve diğer vitamin D dozlarıyla muamele sonrası anlamlı bir değişim göstermemiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. NCI-H929'a 24 ve 48 saatlik farklı dozlarda vitamin D uygulaması sonrası H19 geni ifade değişimi.

Bu sonuçlara göre, H19 ifadesi, 24 saat vitamin D muamelesi gören NCI-H929 hücrelerinde artış eğilimi göstermesine rağmen hem 24 hem de 48 saatte istatistiksel olarak önemli bir değişim sergilememiştir.

H19, MM'de ifadesi yüksek olan onkogenik bir lncRNA'dır. Literatürde VDR'nin H19 ifadesine etkisinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bunlardan VDR'den yoksun fare keratinositleriyle yapılan bir çalışmada, normal keratinositlere kıyasla H19 ifadesinin 4,8 kat arttığı gösterilmiştir. Farklı kolon kanseri hücre hatlarıyla yapılan diğer bir çalışmada, 1-100 nM aralığındaki vitamin D dozlarıyla 48 saat inkübe edilen hücrelerde VDR protein seviyesinde doza bağlı bir artış ve H19 ifadesinde ise azalma tespit edilmiştir (Fan vd., 2019). Aynı hücrelerde H19'un deneysel olarak aşırı ifade edilmesiyle VDR protein seviyesinde azalma ve vitamin D'ye duyarsızlaşma tespit edilmiştir. H19'un birinci ekzonundan kodlanan ve VDR'yi hedef alabilen miR-675-5p'nin H19 ile birlikte aşırı ifade olması, bu hücrelerde VDR protein seviyesini azaltarak vitamin D'ye duyarsızlaşmaya neden olmaktadır.

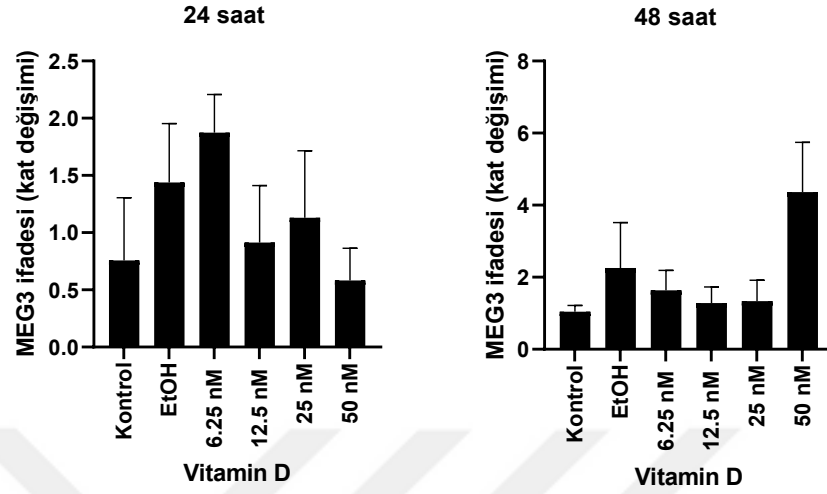
Bu bulgular, VDR ve H19 sinyal yollarının birbirinin ifadesini baskılayıcı rol oynadığını göstermektedir. Bu tez çalışmasında, NCI-H929 hücrelerine vitamin D'nin uygulanması, H19 ifadesinde azalmanın aksine istatistiksel olarak önemli olmayan artışlara yol açmıştır. Bu farklılık, MM'de vitamin D/VDR kompleksinin kolon kanseri hücre hatları veya keratinosit hücrelerindeki farklı düzenleyici faktörlerle etkileşerek H19'un transkripsiyonu ya da stabilitesini etkilediğini düşündürmektedir.

4.4. Vitamin D Uygulamasının MEG3 Geni İfadesine Etkisi

NCI-H929 hücrelerine 24 saat boyunca farklı dozlarda vitamin D uygulandıktan sonra, MEG3 geninin ifadesi incelenmiştir. MEG3, en düşük doz olan 6,25 nM'de, kontrol grubuna kıyasla 2 kat fazla ifade olurken, 12,5 nM'de 0,3 kat artan ifade sergilemiştir (Şekil 4.5). 12,5 nM vitamin D'nin dozu, çözücü kontrolü EtOH'e kıyasla ise MEG3 ifadesini 0,5 kat azaltmıştır. Vitamin D'nin 25 nM dozu ile MEG3 ifadesi, kontrol grubuna göre 0,3 kat artarken, EtOH kontrolüne göre ise 0,6 kat azalmıştır. 50 nM vitamin D uygulaması ise kontrol grubuna göre ifadeyi 0,3 kat azaltmıştır. Ancak, tüm bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir.

NCI-H929 hücresi 48 saat vitamin D ile muamele sonucunda 6,25 nM dozda MEG3 ifadesi kontrol grubuna göre 0,6 kat artarken, EtOH'e kıyasla 0,3 kat azalmıştır (Şekil 4.5). Vitamin D'nin 12,5 nM ve 25 nM dozlarında ise kontrol grubuna göre artış göstermeyen MEG3, EtOH'e kıyasla 1 kat azalmıştır. En yüksek doz olan 50 nM'de ise

MEG3 ifadesi kontrole kıyasla 4 kat, etanole kıyasla 2 kat artmıştır. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.5. NCI-H929'a 24 ve 48 saatlik süreyle farklı dozlarda vitamin D uygulaması sonrası MEG3 geni ifade değişimi

Özet olarak, vitamin D'nin 24 saatlik uygulaması ile MEG3 ifadesinde değişim görülse de özellikle 50 nM vitamin D dozunun 48 saatlik uygulanmasının MEG3 ifadesini artırmada daha etkili olduğu görülmüştür. Doz ve uygulama süresinin MEG3 ifadesinde önemli olduğu belirlenmiştir. MEG3 promotöründe VDRE motiflerinin varlığı, VDR ile kompleks oluşturan Vitamin D'nin, MEG3 ifadesini doğrudan MEG3 promotörüne bağlanarak uyurabileceğine işaret etmektedir. Ancak NCI-H929 hücrelerinin vitamin D ile 24 ve 48 saat muamelesi istatistiksel olarak önemli bir değişim oluşturmamıştır.

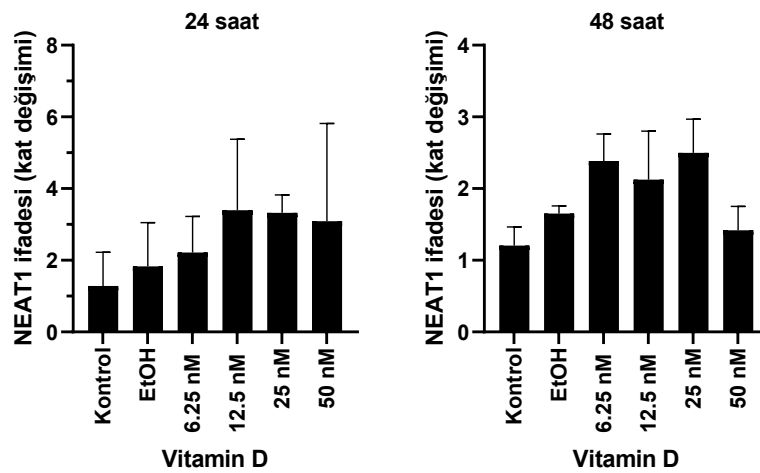
MEG3, tümör baskılayıcı rolleriyle bilinen ve MM'de ifadesi düşük olan bir lncRNA'dır. Literatürdeki bir çalışmada MEG3 ifadesindeki azalmanın MEG3 promotöründe artan DNA metilasyonu nedeniyle olduğu gösterilmiştir (Sellers vd., 2018). SW116 ve RKO kolorektal kanser hücre hatları ile yapılan bir çalışmada, hücrelere vitamin D'nin 24-72 saat uygulanması sonrası MEG3 ifadesinin inkübasyon süresine bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir. MEG3 promotöründe 4 farklı VDR bağlanma bölgesinin tespit edildiği çalışmada, VDR'nin deneysel olarak baskılanmasıyla MEG3 ifadesinin azaldığı saptanmıştır (Zhu vd., 2018). Vitamin D uygulaması sonrası MEG3 promotöründeki metilasyonun azaldığı ve MEG3 ifadesinin arttığı bulunmuştur (Khayami vd., 2022). Bu tez çalışmasında vitamin D muamelesi ile MEG3 ifadesinde anlamlı bir değişim saptanamamasının, vitamin D ile muamele süresine bağlı olabileceği

düşünülmüştür. Nitekim vitamin D/VDR aracılığıyla DNA demetilaz enzimlerinin sentezinin veya aktivitesinin uyarılması ve metile olmuş MEG3 promotörüne yönlendirilmesi gibi zincirleme olaylar vitamin D ile daha uzun süre inkübasyonu gerektirebilir. Kolon kanseri hücreleriyle yapılan benzer bir çalışmada vitamin D ile 72 saat ve üzerinde muamele sonrasında MEG3 ifadesinin arttığı tespit edilmiştir (Zhu vd., 2018). Ancak, bu tez çalışmasında, vitamin D ile 72 saat muamele edilen hücrelerde de MEG3 ifadesinde bir değişim gözlenmemiştir (veri eklenmedi). Bu durum MM hücrelerinde vitamin D'nin uygulanan doz ve sürelerde MEG3 ifadesini etkilemediğini göstermektedir.

4.5. Vitamin D Uygulamasının NEAT1 Geni İfadesine Etkisi

24 saatlik vitamin D uygulaması sonrası 6,25 nM doz ile NEAT1 geninin ifadesinde bir değişiklik oluşmazken, daha yüksek dozlarda (12,5 nM, 25 nM ve 50 nM) NEAT1 ifadesinde kontrol grubuna kıyasla artış eğilimi görülmektedir (Şekil 4.6). Bununla beraber, vitamin D uygulamasıyla gözlenen NEAT1'in transkript seviyesindeki artışlar, istatistiksel olarak anlamlı değildir.

48 saatlik uygulama sonrasında, 6,25 nM vitamin D dozunun grup içinde NEAT1 ifadesinde en yüksek artışı tetiklediği gözlemlenmiştir. Öte yandan, orta ve yüksek vitamin D dozları (12,5 nM, 25 nM ve 50 nM), 6,25 nM doz ile elde edilen NEAT1 ifade düzeyine yakın veya daha düşük düzeyde artışa sebep olmuştur (Şekil 4.6). Ancak, tüm dozlardaki bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı değildir.



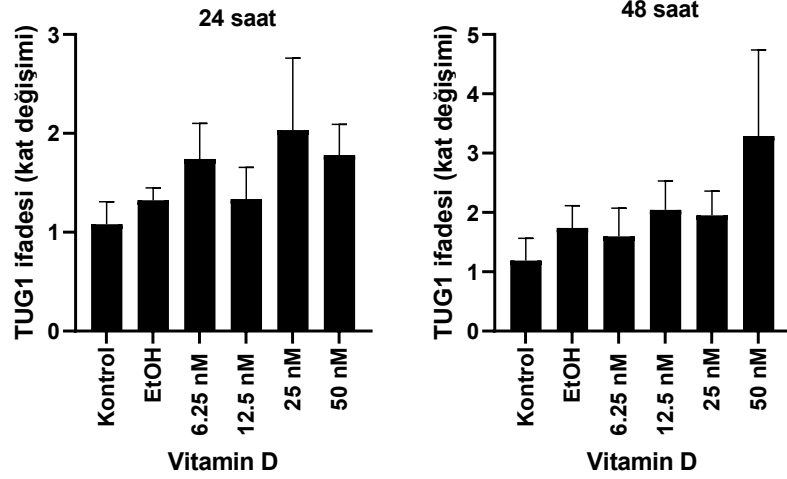
Şekil 4.6. NCI-H929'a 24 ve 48 saatlik vitamin D uygulaması sonrası NEAT1 ifadesi değişimi

Daha önce yaptığımız analizlerle NEAT1 promotöründe VDR bağlanma dizilerinin varlığı (Şekil 4.2) tahmin edilmiş, ancak VDR'nin bu dizilerle fiziksel olarak etkileştiğine dair deneysel bir doğrulama yapılmamıştır. Buna rağmen, literatürdeki çalışmalara göre vitamin D'nin, NEAT1 promotörüne bağlanmak suretiyle doğrudan veya NEAT1 ifadesini uyaran proteinlerin miktarını düzenleyerek dolaylı düzenleyici role sahip olması muhtemeldir. Literatürdeki bir çalışma, NEAT1 promotörüne bağlanarak transkripsiyonu uyardığı bilinen HIF-2 α 'nın protein seviyesinin 50 nM vitamin D ile 8 saatten 24 saate doğru arttığını göstermiştir (Gkoutinakou vd., 2020). Yine NEAT1 ifadesini uyaran SP1'in VDR ile bağlanabildiği ve VDRE dizileri içermeyen genlerin de ifadesinin bu kompleks tarafından uyarılabileceği gösterilmiştir. Ancak, deneysel koşullar ve hücresel farklılıklar sebebiyle, NCI-H929 hücrelerinde vitamin D ile 24 ve 48 saatlik muamele sonucunda lncRNA NEAT1 ifadesinde anlamlı bir değişim oluşmamaktadır.

4.6. Vitamin D Uygulamasının TUG1 Geni İfadesine Etkisi

24 saatlik vitamin D muamelesi sonrası TUG1 ifadesi incelendiğinde, kontrol gruplarına kıyasla etanol ile 0,3 kat, 6,25 nM vitamin D ile 1,6 kat bir artış görülmüştür (Şekil 4.7). Vitamin D'nin 12,5 nM dozunda TUG1 ifade seviyesinde bir değişim gözlenmezken, 25 nM dozunda ise 1,8 kat artış ve 50 nM dozuyla ise 1,7 katlık bir artış saptanmıştır. Ancak, genel olarak vitamin D uygulamasının TUG1 ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmadığı saptanmıştır.

48 saatlik uygulamada ise 6,25 nM dozunda TUG1 ifadesinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.7). TUG1 ifadesi, 12,5 nM ve 25 nM dozlarda 0,7 katlık bir artış gösterirken, 50 nM vitamin D dozunda ise kontrol grubuna göre 3 kat artış göstermiştir. Ancak, 48 saatlik vitamin D dozlarında TUG1 ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.



Şekil 4.7. NCI-H929'a 24 ve 48 saatlik vitamin D uygulaması sonrası TUG1 geni ifade değişimi

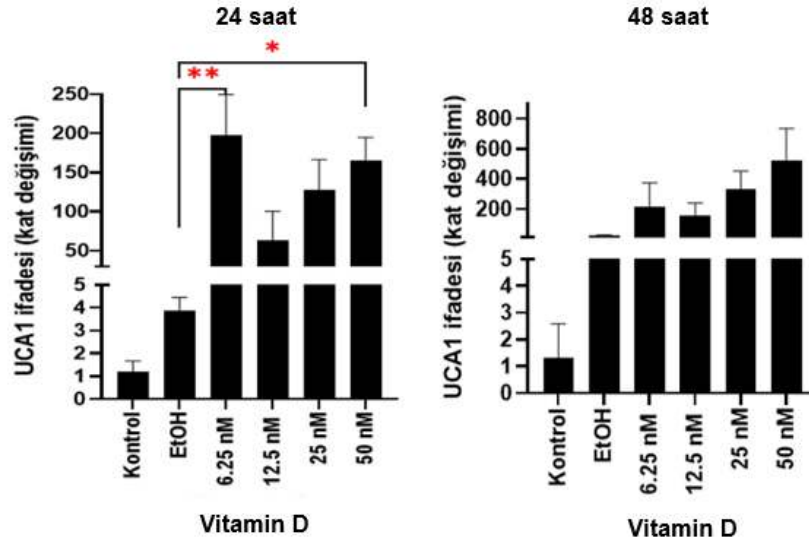
TUG1, MM'de ifadesi yüksek onkogenik bir lncRNA'dır. Yapılan araştırmalarda transkripsiyon faktörü NRF2'nin ürotelyal karsinoma hücre hatları 5637, T24 ve EJ-1'de TUG1 ifadesini pozitif düzenlediği keşfedilmiştir (Sun vd., 2019). Farklı bir çalışmada ise vitamin D'nin NRF2 ifadesini artırarak antioksidan düzenleyici sinyal yolağını aktive ettiği bulunmuştur (Nakai vd., 2014). Bu deney sonuçları vitamin D-aracılı TUG1 ifadesinin uyarılabildiğini düşündürmektedir. Vitamin D'nin NCI-H929 hücrelerinde hangi molekülleri düzenlediği net değildir. Ancak, 48 saatlik inkübasyon süresinde en yüksek doz olan 50 nM'da TUG1 ifadesinin artış eğilimi göstermesi, hücredeki TUG1 yanıtının sonradan tetiklenebileceğini göstermektedir.

4.7. Vitamin D Uygulamasının UCA1 Geni İfadesine Etkisi

NCI-H929 hücrelerinin 24 saat etanol ile muamele edilmesi sonucu, UCA1 ifadesi kontrol grubuna kıyasla 3,8 kat artmıştır (Şekil 4.8). Bu durum göz önüne alınarak tüm analizlerde ikili kıyaslamalar, EtOH kontrol grubu ile yapılmıştır. Vitamin D'nin en düşük dozu olan 6,25 nM, hücrelerde UCA1 ifadesini 197 kat arttırmıştır. Vitamin D dozu 12,5 nM'e çıkarıldığında, UCA1 ifadesi kontrole kıyasla 63 kat, 25 nM dozu ile 127 kat ve 50 nM ile 165 kat artış göstermiştir. Oluşan artışlar, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

NCI-H929 hücrelerinin Vitamin D ile muamele süresi 48 saate çıkarıldığında, UCA1 gen ifadesinde 24 saatlik uygulamaya benzer bir artış eğilimi tespit edilmiştir (Şekil 4.8). Etanole kıyasla, 6,25 nM vitamin D muamelesi sonrası UCA1 ifadesi 40 kat, 12,5 nM doz ile 7,61 kat ve 25 nM ile 16,2 kat artmıştır. En yüksek vitamin D dozu olan

50 nM vitamin D ise UCA1 ifadesini 25,6 kat arttırmıştır. Bu ifade artış miktarlarının hiçbirisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 4.8. NCI-H929’a 24 ve 48 saatlik vitamin D uygulaması sonrası UCA1 geni ifade değişimi

Literatürdeki bir çalışmaya göre, alkole bağlı karaciğer yağlanması olarak bilinen “alcoholic fatty liver” hastalarında ve etanol ile muamele edilmiş L02 insan hepatosit hücre hattında, UCA1 ifadesi artmaktadır (Xiang vd., 2022). Etanolün hepatositlerdeki UCA1 ifadesini uyarıcı etkisiyle uyumlu olarak bu tez çalışmasında kullanılan etanol kontrolünün yüzdesi de UCA1 ifadesini artırmıştır. Ayrıca, vitamin D, çözücüsü olan etanolün neden olduğu artışı daha da artırarak UCA1 ifadesinde ek bir yükselişe neden olmuştur. UCA1, sağlıklı bir hücrenin kanserleşme sürecini destekleyen ve MM’de ifadesi yüksek bir lncRNA’dır. UCA1, çeşitli miRNA’ları ve mRNA kodlayan genlerin ifadesini düzenleyebilmekte ve kendisinin ifadesi de transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenmektedir. Bunlardan C/EBPα (CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha), özellikle hematopoezde önemli rollere sahip ve UCA1 ifadesini artıran bir transkripsiyon faktörüdür. UCA1’in promotörüne doğrudan bağlanarak transkripsiyonunu aktive eden C/EBPα’nın kendisi de vitamin D tarafından düzenlenebilmektedir. Meme kanseri hücre hattı MCF-7 ile yapılan bir çalışmada, 1-10 nM vitamin D ile 24 saat inkübasyon sonucunda hücrelerdeki C/EBPα ifadesinin 4 kat arttığı tespit edilmiştir (Dhawan vd., 2009). Bu durum vitamin D’nin transkripsiyon faktörü C/EBPα ifadesini uyararak UCA1 ifadesini artırabileceğini düşündürmektedir. Bu tez çalışmasında UCA1 ifadesinde

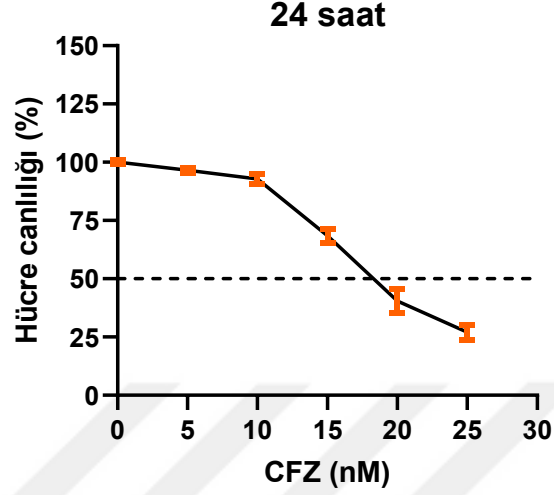
görülen artışın da bu etkileşim aracılığıyla gerçekleşmesi oldukça muhtemeldir. Literatürdeki farklı bir çalışmada ise meme epitel hücrelerinde HIF-1 α 'nın vitamin D tarafından düzenlendiği bulunmuştur. Vitamin D'nin 10 nM dozuyla 12 saat boyunca inkübe edilen MCF10A hücrelerinde, HIF-1 α 'nın hem mRNA hem protein seviyesinde azalsına neden olduğu tespit edilmiştir. Transkripsiyon faktörü HIF-1 α 'nın UCA1 promotörünün hipoksi yanıt elemanlarına (HRE'ler) doğrudan bağlanarak mesane ve yumurtalık kanseri hücrelerinde lncRNA UCA1 ekspresyonunu hipoksiye bağımlı bir şekilde artırdığı tespit edilmiştir (Wang vd., 2017). Vitamin D'nin genomdaki düzenleyici rollerinin çeşitliliği ve lncRNA'ların düzenlenme mekanizmalarının çok fonksiyonlu oluşu, bu etkiyi açıklamayı güçleştirmektedir.

4.8. Vitamin D-Carfilzomib Kombine Uygulamasının NCI-H929'un Canlılığına Etkisi

MM hastalarının büyük çoğunluğunda eksikliği görülen vitamin D, kanser tedavisinde en sık kullanılan takviyelerden biridir. Bu çalışmada vitamin D'nin tek başına lncRNA ifadesine etkisine dair veriler elde edilmekle birlikte, tedavi sürecinde hastalara ilaçlarla kombine edilerek verilmesi daha muhtemel olduğundan vitamin D'nin bir anti-MM kemoterapi ajanıyla birlikte verilmesinin etkilerine de bakılmıştır.

Bu amaçla, MM'de yaygın kullanılan ikinci nesil proteazom inhibitörü olan carfilzomib tercih edilmiştir. Carfilzomibin geri dönüşümsüz olarak bağlandığı 26S proteazom kompleksi, hem sitoplazmada hem de çekirdekte pek çok proteinin yıkımından sorumlu ubiquitin proteazom sisteminin bir parçasıdır (Kaiser vd., 2013). Ubikitin aktive edici enzim E1, ubiquitin konjuge edici enzim E2 ve ubiquitin ligaz enzimi E3 aracılığıyla ubiquitinasyona uğrayan protein, proteazomda peptit ve aminoasitlere kadar yıkılır (Mofers vd., 2020). Carfilzomib, proteazomun 20S çekirdek partikülünün içindeki kimotripsin benzeri aktif bölgelere kovalent olarak bağlanır. Bu bağlanma, geri dönüşümsüzdür ve proteazomun proteinleri parçalama yeteneğini kalıcı olarak inhibe eder. Proteazomun inhibe olmasıyla hücrede biriken yıkılamamış proteinler MM hücrelerinde sitotoksositeye neden olarak hücre ölümünü uyarmakta ve bu sayede tümör hücre yükü azalan hastanın sağ kalım süresi önemli ölçüde artmaktadır (Jayaweera vd., 2021). Birinci nesil proteazom inhibitörü bortezomibe dirençli hastalarda kullanılan CFZ, tüm bu özellikleri değerlendirilerek MM hücrelerine vitamin D ile kombine uygulanacak kemoterapi ajanı olarak seçilmiştir.

Öncelikle CFZ'nin NCI-H929 hücrelerinde kullanılacak dozunun belirlenmesi için hücreler 5 nM-25 nM aralığındaki farklı CFZ dozlarıyla 24 saat muamele edildikten sonra MTT analizi yapılmıştır (Şekil 4.9).



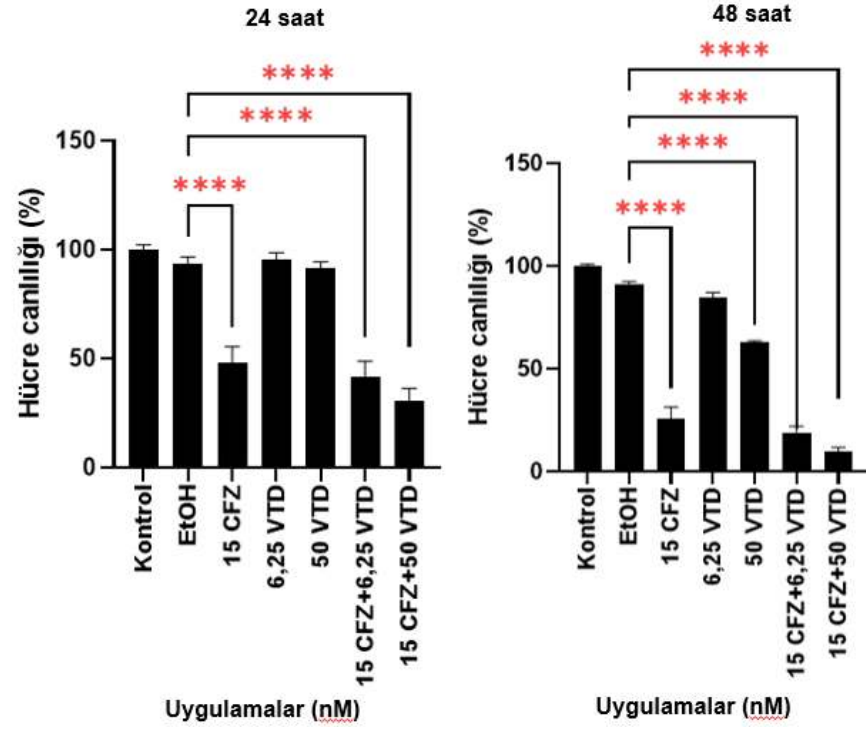
Şekil 4.9. Carfilzomib uygulamasının NCI-H929 hücre canlılığına etkisi. Her biri 4 teknik ve 3 biyolojik tekrar olarak yapılan 24 saatlik CFZ uygulaması sonrasında, canlı hücre oranı MTT ile analiz edilmiştir.

Canlı hücre oranları, 5 nM CFZ'de %96,5, 10 nM'de %92,7 iken 15 nM CFZ ile %65,4'e düşmektedir. Carfilzomibin 20 nM dozu ile canlı hücre oranı %40,4'e ve 25 nM doz ile %27'ye gerilediği görülmüştür. 24 saat CFZ'nin NCI-H929 hücreleri için IC50 değeri 17,11 nM olarak hesaplanmış ve buna en yakın CFZ dozu olan 15 nM'in vitamin D ile kombine uygulamalarda kullanılmasına karar verilmiştir.

Daha sonra, vitamin D ve carfilzomib'in tekli ve kombine uygulanacak dozlarının farklı sürelerde NCI-H929 hücre canlılığına etkisi MTT yöntemiyle analiz edilmiştir. Uygulanacak tekli koşullar sırasıyla; etanol, 0 nM, 15 nM CFZ, 6,25 nM ve 50 nM vitamin D'dir. Kombine koşullar, 15 nM CFZ'nin vitamin D'nin 6,25 nM ve 50 nM dozu ile birlikte uygulandığı koşullardır.

NCI-H929 hücrelerine 24 saatlik kombine vitamin D-CFZ uygulaması sonrasında, tekli uygulanan düşük (6,25 nM) ve yüksek (50 nM) vitamin D dozları ile hücrelerin canlılığının değişmediği, 15 nM carfilzomibin tek başına uygulanmasıyla canlılığın %53 oranında azaldığı görülmüştür (Şekil 4.10). Buna karşın, 15 nM CFZ ile kombine edilen 6,25 nM vitamin D dozu ile, canlı hücrelerin sayısının %59 oranında, 50 nM vitamin D ile kombinasyon sonucu ise %70 oranında azaldığı görülmüştür.

48 saatlik sürede ise, tekli uygulanan 15 nM carfilzomib hücre canlılığını %74 oranında azaltmış, ancak 6,25 nM ve 50 nM vitamin D'nin tek başına uygulandığı hücrelerde canlılık, sırasıyla %14 ve %33 oranında azalmıştır (Şekil 4.10). Bununla birlikte, 15 nM CFZ ile kombine edilen 6,25 nM vitamin D'nin hücre canlılığını %19'a, 50 nM vitamin D'nin ise %10'a düşürmesi dikkati çekicidir.



Şekil 4.10. NCI-H929'a 24 saat vitamin D ile kombine carfilzomib uygulamasının hücre canlılığına etkisi

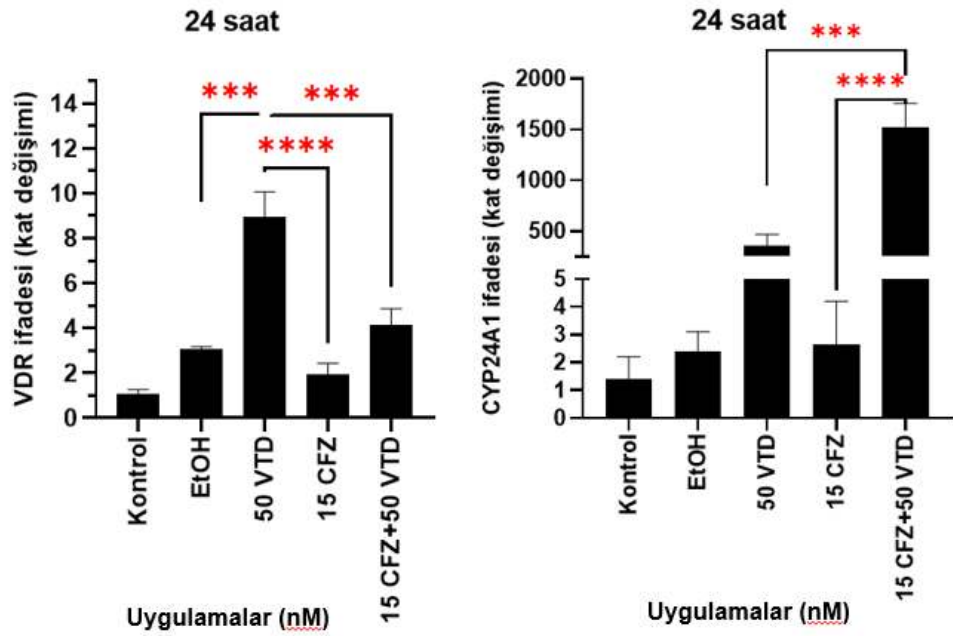
Bu bulgular, vitamin D'nin carfilzomibin hücre ölümüne yol açan etkilerini artırabileceğini göstermektedir.

4.9. Vitamin D-Carfilzomib Kombine Uygulamasının VDR ve CYP24A1 Genlerinin İfadesine Etkisi

Carfilzomib uygulaması sonucu bloke olan proteazom aktivitesi, hücrede vitamin D metabolizmasında önemli VDR ve CYP24A1 proteinlerinin de yığılmasına yol açar (Mofers vd., 2020). Vitamin D ile mRNA ve protein seviyesi artan VDR ve CYP24A1'in, carfilzomib uygulamasıyla hücrede yığılması daha uzun süre etki göstermesi beklenir. Vitamin D ve carfilzomibin kombine uygulandığı NCI-H929 hücrelerinde VDR ve CYP24A1 mRNA seviyelerindeki değişim qRT-PCR ile analiz edilmiştir. NCI-H929 hücrelerinin EtOH ile 24 saat muamelesi sonucu VDR ifadesi 2 kat artmıştır.

Carfilzomibin 15 nM dozu ile inkübe edilen hücrelerde, VDR ifadesi çözücü kontrolü olan etanol grubuna yakın seviyededir (Şekil 4.11). VDR ifadesi 50 nM vitamin D uygulaması sonrasında hem CFZ hem de EtOH kontrolüne kıyasla 9 kat artmıştır. Buna karşın, kombine uygulama ile VDR ifadesi, 50 nM vitamin D uygulamasına kıyasla 2,25 kat azalmıştır.

NCI-H929 hücrelerinde CYP24A1 ifadesi 50 nM vitamin D uygulaması sonrasında, kontrol grubuna kıyasla 252 kat artarken 15 nM carfilzomib ile sadece 1,8 kat artmıştır (Şekil 4.11). Buna karşın, kombine uygulamada CYP24A1 ifadesi 50 nM vitamin D uygulamasına kıyasla 4,3 kat artmıştır. Özetle, vitamin D-CFZ kombinasyonu NCI-H929 hücrelerinde en yüksek CYP24A1 ifadesini uyaran koşuldur.



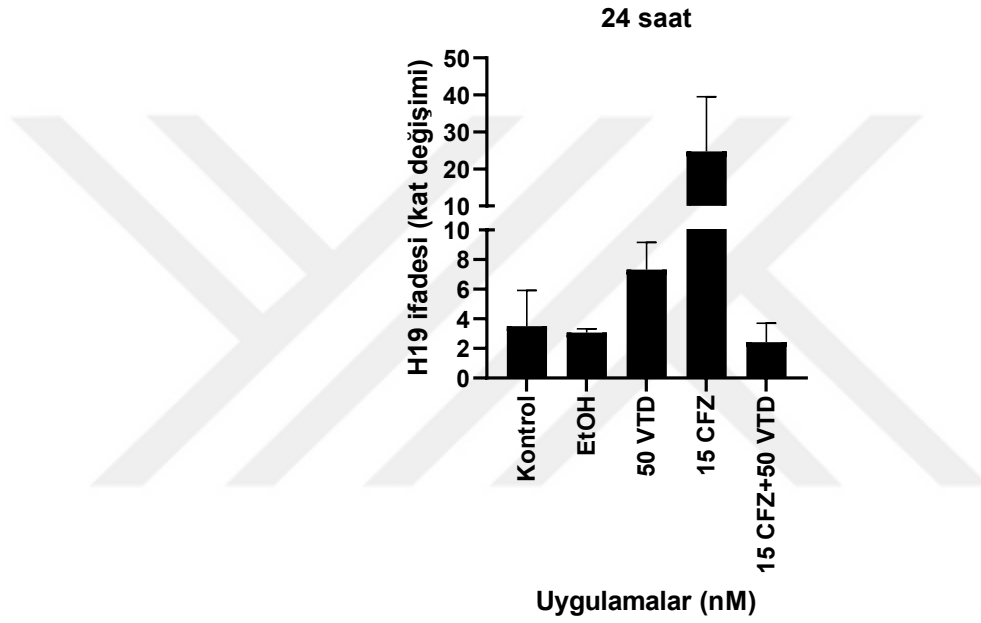
Şekil 4.11. NCI-H929'a vitamin D carfilzomib kombine uygulamasından 24 saat sonra VDR ve CYP24A1 ifadesindeki değişim

4.10. Vitamin D-Carfilzomib Kombine Uygulamasının H19 Geni İfadesine Etkisi

NCI-H929 hücrelerinde 24 saatlik muamele sonrası, lncRNA H19 ifadesi, EtOH grubunda muamele görmemiş hücre kontrolüne kıyasla bazal seviyede kalırken, 50 nM vitamin D ile 2 kat, 15 nM CFZ ile 7 kat artmıştır. Buna karşın, vitamin D-carfilzomib kombine uygulaması ile H19 ifadesi, 15 nM CFZ'ye kıyasla 10 kat, 50 nM vitamin D'ye göre ise 3 kat azalarak gruplar arasında en düşük seviyeye inmiştir (Şekil 4.12). CFZ uygulaması, proteazom inhibisyonu sağlayarak, hücrede lncRNA ifadesini artıran

transkripsiyon faktörlerinin, stres yanıt yolağı bileşenlerinin ve lncRNA'ya bağlanarak stabilitesini artıran proteinlerin de ortamda yığılmasını sağlayacaktır. Tüm bu protein faktörlerin ortamda birikmesi, lncRNA sentezini veya stabilitesini artırarak, lncRNA transkript seviyesinde de yükselmeye neden olmuştur.

Ancak, vitamin D ve CFZ'nin birlikte uygulanması, H19 seviyesini azaltarak kontrol grubu seviyesine indirmiştir. Kombine grupta H19 seviyesinde gözlenen bu azalma istatistiksel olarak önemli olmasa da en düşük H19 seviyesinin sadece bu grupta görülmesi, kombine uygulamanın potansiyel önemine işaret etmektedir.



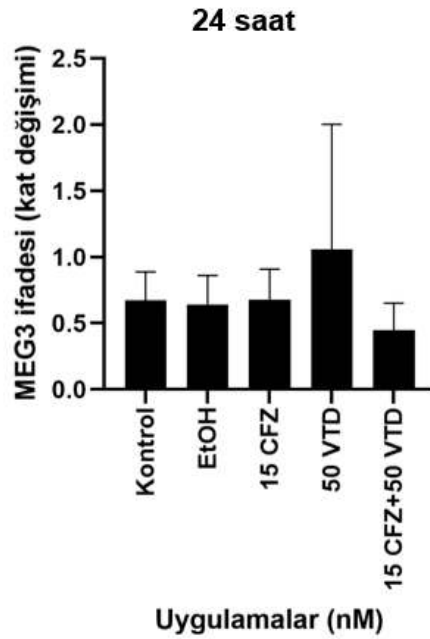
Şekil 4.12. NCI-H929'da 24 saat vitamin D-CFZ kombine uygulaması sonrası H19 ifadesinin değişimi

H19, MM'de ifadesi yüksek olan ve myelom hücrelerinin hayatta kalmasını teşvik eden bir lncRNA'dır. Bu çalışmada, vitamin D ve carfilzomib kombinasyonunun H19 ifadesini azalttığı gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda, lncRNA H19 ifadesinin, transkripsiyon faktörü HIF-1 α tarafından pozitif düzenlendiği bulunmuştur (X. Peng vd., 2020). Ayrıca, H19'un HIF-1 α tarafından tetiklenmesi ve aşırı ifadesi, miyelom hücrelerinde birinci nesil proteazom inhibitörü olan bortezomibe duyarlılığı azaltmaktadır (Matouk et al., 2010). Başka bir çalışmada ise, HIF-1 α ifadesinin hem serbest vitamin D hem de vitamin D/VDR kompleksi aracılığıyla baskılandığı bildirilmiştir (Gkoutinakou et al., 2020). Bu bağlamda, vitamin D ile kombine edilen carfilzomibin, VDR'nin yıkımını yavaşlatarak ortamda daha uzun süre stabil kalmasını

sağladığı ve bu sayede VDR'nin HIF-1 α 'nın transkripsiyonunu baskılaması ile H19 ifadesini azaltması oldukça muhtemeldir.

4.11. Vitamin D-Carfilzomib Kombine Uygulamasının MEG3 Geni İfadesine Etkisi

NCI-H929 hücrelerinin 15 nM CFZ ile muamele edilmesi her iki kontrole kıyasla MEG3 ifadesinde bir değişikliğe yol açmamıştır (Şekil 4.13). Ancak, hücrelerin 24 saat boyunca 50 nM vitamin D ile muamele edilmesi MEG3 ifadesinde 0,5 katlık bir artışa neden olmuştur. CFZ ve vitamin D'nin kombine uygulanması sonrasında ise MEG3 ifadesi kontrol gruplarına kıyasla 0,2 oranında azalmıştır. Hem tek başına hem de birlikte kullanıldığında, vitamin D ve CFZ' nin MEG3 ifadesini istatistiksel olarak değiştirmedığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, 24 saatlik uygulamalarda MEG3'ün transkript seviyelerinin, vitamin D ve CFZ tarafından düzenlenmediğini göstermektedir.



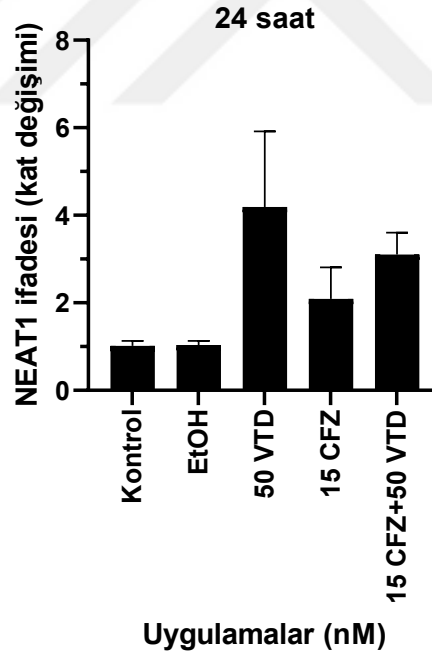
Şekil 4.13. NCI-H929’da 24 saat vitamin D-CFZ kombine uygulaması sonrası MEG3 ifadesinin değişimi

Her ne kadar, vitamin D ve MEG3 doğrudan etkileşimleri de literatürdeki bilgiler ortak hücresel mekanizmaları yönetebileceklerini göstermektedir. Bortezomibe dirençli MM hücrelerinde lncRNA MEG3 ifadesinin artması otofajiyi inhibe ederek bortezomibe olan duyarlılığı artırmaktadır (Zang vd., 2022). Bu hücresel yanıtın mekanizmasına bakıldığında, RNA’ya bağlanarak stabilitesini artırıcı rol oynayan PTBP1

(Polyprimidine tract-binding protein 1)'in MEG3 tarafından alıkonulmasıyla, otofajiyi indükleyen ATG2B proteininin seviyesinin azalması olduğu bulunmuştur. Farklı bir çalışmada vitamin D'nin ATG2B'yi hedef alan mir-375'in ifadesini artırarak otofajiyi baskılayabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada vitamin D-CFZ'nin kombine uygulandığı kültür koşullarında artan hücre ölümleri, MEG3 ve vitamin D tarafından ATG2B-aracılı otofaji mekanizmasının baskılanmasının sonucu olabilir. Bu da ortak moleküler hedefleri düzenleme yoluyla lncRNA-vitamin D dolaylı etkileşimlerinin önemine işaret etmektedir.

4.12. Vitamin D-Carfilzomib Kombine Uygulamasının NEAT1 Geni İfadesine Etkisi

NCI-H929 hücrelerinin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda, etanol muamelesi NEAT1 ifadesini değiştirmemiştir (Şekil 4.14). Tek başına uygulanan 50 nM vitamin D ile hücrelerde NEAT1 ifadesinde yaklaşık 4 katlık bir artış görülürken, 15 nM CFZ ile yaklaşık 2 kat artış tespit edilmiştir. İki ajanın birlikte kullanılmasıyla, NEAT1 ifadesi 15 nM CFZ'ye oranla 1,5 kat artarken, 50 nM vitamin D'ye oranla 1,3 kat azalmıştır. Ancak bu değişimler istatistiksel önem seviyesine ulaşmamıştır.



Şekil 4.14. NCI-H929'da 24 saat vitamin D-CFZ kombine uygulaması sonrası NEAT1 ifadesinin değişimi

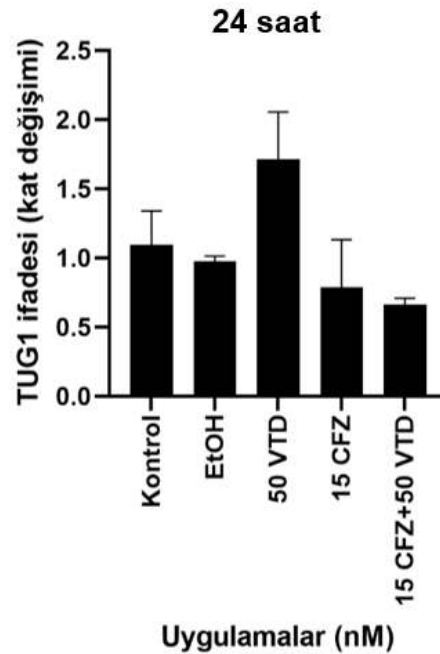
Literatürde yer alan önceki çalışmalarda, NEAT1 ifadesinin MM hücrelerinde arttığı ve bu artışın özellikle proteazom inhibitörleri ile muamele edilen hücrelerde daha

belirgin olduğu görülmüştür (Taiana vd., 2020). Protein yığılması ile oluşan stres, NEAT1'in bu stresi baskılamada görev alan nükleer paraspeckle yapılarına daha çok katılmasını sağlamıştır. Katılımdaki bu artışın transkripsiyon seviyesinde olduğu gözlemlenmiştir. Dolayısıyla, CFZ uygulanan hücrelerde NEAT1 ifadesinin artması, önceki çalışmalarla uyumludur. Bu artışın moleküler mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte proteazomun baskılanması sonucu ortamda artan SP1 gibi transkripsiyon faktörlerinin NEAT1 promotörüne bağlanarak NEAT1 ifadesini artırması olasıdır.

Kombine uygulama sonucunda NEAT1 ifadesinde anlamlı bir artış görülmemesi, her iki ajanın uyardığı baskılayıcı veya aktive edici moleküllerin etkileşimi nedeniyle mRNA seviyesinin değişmemiş olmasından kaynaklanabilir.

4.13. Vitamin D-Carfilzomib Kombine Uygulamasının TUG1 Geni İfadesine Etkisi

NCI-H929 hücrelerinde, 24 saatlik etanol muamelesi ile bazal TUG1 seviyeleri değişmezken, 50 nM vitamin D dozuyla 1,7 kat artmıştır (Şekil 4.15). Tek başına ve vitamin D ile birlikte uygulanan 15 nM CFZ dozlarında ise TUG1 seviyesinde kısmi azalmalar görülsede bu değişimler önemli bulunmamıştır.



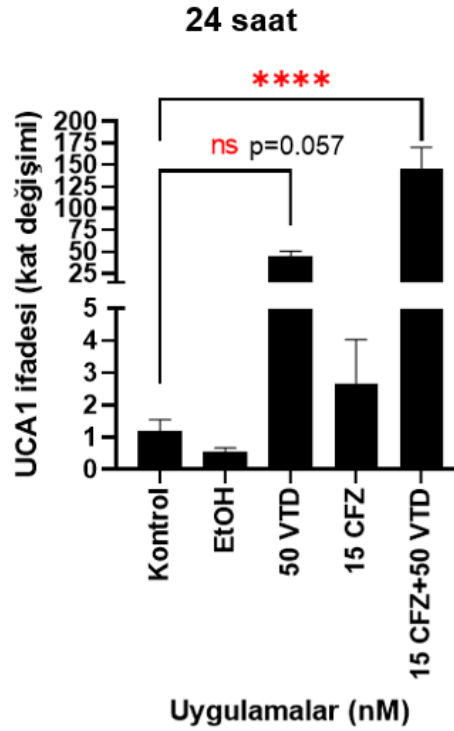
Şekil 4.15. NCI-H929’da 24 saat vitamin D-CFZ kombine uygulaması sonrası TUG1 ifadesinin değişimi

MM hücre hattı RPMI-8226 ve U266 hücreleriyle yapılan bir çalışmada, bortezomibe duyarlılığı azalan bu hücrelerde lncRNA TUG1 ifadesinin aynı hücre hatlarına oranla daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Yin vd., 2023). Daha sonra yapılan deneylerde MM'de ifadesi artan bir transkripsiyon faktörü olan YY1 (Yin Yang 1)'in, promotörüne bağlandığı TUG1'in ifadesini artırdığı bulunmuştur (Yin vd., 2023). İfadesi artan TUG1'in ubiquitini uzaklaştırma aktivitesine sahip YOD1 deubikitinaz proteini ile etkileşmesi, apoptozun baskılanmasına ve MM hücrelerinde proteazom inhibitörüne duyarlılığın azalmasına neden olmuştur. TUG1 ifadesinin baskılanmasıyla miyelom hücrelerinde ilaca duyarlılığın arttığı da bulgular arasında yer almaktadır. YY1'in TUG1 ifadesini teşvik edici rolünün aksine, VDR/RXR kompleksi-aracılı transkripsiyonel etkileri baskıladığına dair bulgular mevcuttur. Çok işlevli regülatör YY1'in, kemik dokusuna özgü osteokalsin geni ve vitamin D katabolize edici CYP24A1 geni promotöründeki VDRE dizisine bağlanabildiği ve bu iki genin vitamin D/VDR aracılı transkripsiyonunu baskıladığı tespit edilmiştir (Raval-Pandya vd., 2001). Bu inhibisyonun YY1'in, VDR/RXR kompleksinin VDRE dizilerine bağlanmasını veya diğer transkripsiyon faktörleri (TFIIB gibi) ile etkileşimini baskılaması sonucu olduğu saptanmıştır (Lian vd., 2001). Bu durumda hem tekli hem kombine uygulama koşullarında vitamin D'nin TUG1 ifadesinde bir değişime yol açmaması, YY1 aracılı inhibisyonun sonucu olabilir.

4.14. Vitamin D-Carfilzomib Kombine Uygulamasının UCA1 Geni İfadesine Etkisi

NCI-H929 hücrelerinin çözücü kontrolü olan EtOH ile 24 saat muamelesi sonrasında hücrelerde UCA1 ifadesi 0,5 kat azalmıştır (Şekil 4.16). 50 nM Vitamin D uygulamasıyla UCA1 ifadesinde kontrole kıyasla 44 kat artış gözlenmesine rağmen, deney setleri arasındaki varyasyon nedeniyle bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. CFZ'nin 15 nM dozuyla muamele edilen NCI-H929 hücrelerinde ise 2,7 katlık bir ifade artışı kaydedilmiştir. İlginç bir şekilde, bu iki ajanın kombine kullanılmasıyla lncRNA UCA1'in transkript seviyesi 145 kat artmıştır. Vitamin D ve CFZ aracılı etkilerin birleşimi ile bu önemli artışın uyarıldığı düşünülebilir. NCI-H929 hücrelerinin vitamin D ile 24 ve 48 saat inkübasyonu sonrası UCA1 ifadesindeki artış, deney çalışmasının ilk basamağında tespit edilmişti. Kombine deney grubunda 50 nM vitamin D dozunda UCA1 ifadesinin arttığı ve tek başına carfilzomib ile bu artışın vitamin D'ye oranla bir miktar düşük kaldığı tespit edildi. İlginç olan ise iki ajanın kombine

uygulanmasıyla NCI-H929 hücrelerinde UCA1 ifadesinin en fazla artışı göstermesi olmuştur.



Şekil 4.16. NCI-H929’da 24 saat vitamin D-CFZ kombine uygulaması sonrası UCA1 ifadesinin değişimi

Önceki çalışmalar, carfilzomibin proteazomu inhibe ederek hücrede yığılan proteinler sebebiyle stres yanıtını uyarması ve buna bağlı olarak lncRNA UCA1 ifadesinin de artabileceğini işaret etmektedir (Cai vd., 2019). Promotöründe çoklu VDRE elementlerinin varlığı tahmin edilen UCA1’in (Şekil 4.2), Vitamin D ile kompleks oluşturarak çekirdeğe transfer olan VDR reseptörü aracılığıyla ifadesinin artması muhtemeldir. Diğer taraftan, carfilzomibin ortamda bulunması vitamin D bağlayıcı protein, VDBP ve VDR’nin de yıkımını engelleyerek UCA1’in transkripsiyonunun uzun süre aktif kalmasını sağlayabilir. CFZ ve vitamin D’nin farklı mekanizmalarla UCA1 seviyesinde yol açtığı artış, kombine grupta birbirine eklenerek daha belirgin hale gelmiştir.

Bu tez çalışmasında MM’deki etkileri daha önce kısmen bilinen beş farklı lncRNA’nın transkript seviyelerinin vitamin D/VDR yolağı aracılı değişimleri araştırılmıştır. MM hastalarında çoğunlukla eksikliği gözlenen vitamin D’nin, fizyolojik doz aralığında myelom hücrelerinin canlılığını azalttığı görülmüştür.

Farklı vitamin D dozları uygulanan NCI-H929 hücrelerinde, VDR ve CYP24A1 ifadesinde istatistiksel olarak önemli artış gözlenmiştir. İfade değişimleri araştırılan hedef lncRNA'lardan; H19, MEG3, NEAT1, TUG1 transkript seviyelerinde bu koşullarda önemli bir değişim gözlenmezken, UCA1 ifadesinin 24 saatte 6,25 nM vitamin D dozu ve 48 saatte 50 nM vitamin D dozu ile istatistiksel olarak önemli bir artış gösterdiği bulunmuştur.

Proteazom inhibitörü CFZ'nin tek başına uygulandığı koşula kıyasla vitamin D ile kombine uygulanması daha düşük hücre canlılığına neden olmuştur. Aynı uygulama koşullarında VDR transkripti en çok tekli vitamin D grubunda, daha sonra sırasıyla kombine ve tekli CFZ uygulanan grupta kontrolden daha yüksek seviyede ifade göstermiştir. CYP24A1 ifadesi CFZ ile değişmemiş, vitamin D ile artmıştır; kombine grup ise her iki ajanın tekli uygulandığı gruplardan daha yüksek seviyeye ulaşmıştır. Yine aynı hücre grubunda, MEG3 ve TUG1 ifadesinde önemli bir değişim gözlenmemiştir. H19 ifadesi her iki ajanın tekli uygulandığı gruplarda artış eğilimi gösterirken kombine uygulama ile bazal seviyeye geri dönmüştür. NEAT1 ifadesi, vitamin D ile 4 kat artarken, CFZ ile 2 kat artmış ancak kombine grupta vitamin D'nin tekli uygulandığı koşuldan daha düşük ifade göstermiştir. UCA1 transkript seviyesi, vitamin D ile 44 kat artarken, CFZ ile 2,7 kat artmış ancak kombine uygulama ile vitamin D'nin tek başına oluşturduğu seviyeden daha yüksek ifade olduğu tespit edilmiştir.

Literatürdeki çalışmalar temel alınarak kurgulanan bu çalışmadaki vitamin D dozlarının hücre canlılığını etkilemediği ilk 24 saatin, hedef lncRNA seviyelerindeki transkripsiyonel değişimlerin en belirgin olduğu zaman dilimi olduğu, buna karşın hücre sayısında azalmanın kendini gösterdiği 48 saatte ise transkripsiyonel değişimlerin dengelendiği gözlenmiştir. Bu durum lncRNA gibi genlerin erken dönemde RNA seviyesinde kendini gösteren değişimlerinin ilerleyen zaman diliminde translasyonel ifade değişimlerini ve buna bağlı farklı hücresel davranışları tetiklediğini göstermektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Vitamin D, güneşten gelen UVB ışınlarıyla vücut içerisinde sentezlenen bir pre-hormondur. Vitamin D'nin VDR/RXR ile kompleksi insan genomunda 2776 bağlanma bölgesine sahip olup, insan genomunun %5'inin ifadesini düzenleyebilmektedir (Carlberg vd., 2012). İlginç bir şekilde vitamin D kendi reseptörüne bağlanmadan gen ifadesini düzenleyebildiği gibi, VDR de vitamin D'den bağımsız şekilde gen ifadesini etkileyebilmektedir. Bu yönüyle, vitamin D/VDR sinyal yolağı genom çapında önemli bir düzenleyici statüye sahiptir.

Vitamin D eksikliği, genel olarak kanser başta olmak üzere pek çok hastalık türünün gelişimine ve ilerlemesine sebep olmaktadır. Vitamin D eksikliğinin MGUS, SMM ve MM evreleri arasındaki dönüşümü desteklediği ve MM'li bireylerin %44'ünde normalin altında olduğu tespit edilmiştir (Ismail vd., 2023)

Genom içerisinde 200 nükleotitten uzun bol tekrar dizileri içeren lncRNA genleri de ifadesi vitamin D tarafından düzenlenen genler arasındadır. İfade olduklarında farklı tipte moleküllerle etkileşerek hücresel olayları yöneten lncRNA'lar, ifadelerindeki anormallikler nedeniyle kanserleşme sürecinde de rol alırlar. Bir lncRNA ifadesinin uyarılması veya baskılanması kanserli hücrenin hayatta kalmasını destekleyecek mekanizmaları düzenleyebilir. Bu süreç sonunda hücrede proliferasyonun artması, ilaca direnç gelişmesi, invazyon ve metastazın artması gibi pek hücresel fonksiyon değişime uğramaktadır.

Bu bilgiler ışığında vitamin D'nin MM'de önemli rolleri olan 5 hedef lncRNA ifadesine etkisini incelemek amacıyla bu tez çalışması gerçekleştirilmiştir. MM'de ifadesi yüksek olan onkogenik lncRNA H19'un, vitamin D ile carfilzomib'in kombine uygulanması sonucu ifadesinin azaldığı bulunmuştur. lncRNA UCA1 ifadesinin, hem vitamin D tarafından hem de vitamin D-carfilzomib kombine uygulamasıyla transkripsiyonel seviyede tetiklendiği bulunmuştur. Bu bağlamda, vitamin D'nin hastalarda kullanımının güvenilirliğini, onkogenik bir lncRNA'nın ifadesini artırması sebebiyle şüphelidir. Vitamin D'nin ve CFZ'nin UCA1 ifadesini tetiklemesine rağmen, hücre döngüsünü baskılaması ve MM hücrelerinin ölümünü uyarması, vitamin D varlığında UCA1'in onkogenik etkisinden farklı bir işlevi yönetebileceği ya da vitamin D'nin UCA1 ile oluşacak olumsuz etkileri telafi edecek alternatif mekanizmaları devreye soktuğunu düşündürmektedir. Nitekim, genomun önemli bir yüzdesinin ifadesini kontrol edebilen vitamin D'nin neden olduğu hücresel yanıtlar, tek bir hedefin aktivasyonundan

ziyade uyardığı tüm moleküler hedeflerin toplam etkisi sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu açıdan bakıldığında, Vitamin D ve CFZ muamelesiyle görülen UCA1 artışının MM patogenezindeki rolünü aydınlatmak için, bu ajanların tekli ve kombine uygulandığı hücrelerde, UCA1 promotörüne bağlanan protein faktörlerin ve hangi hücreyel olaylarla ilişkili olduklarının tespiti yapılabilir. Bunun yanı sıra, VDR ifadesinin arttığı ve baskılandığı deneysel koşullarda, UCA1'in ifadesinin genetik olarak modüle edilmesinin MM hücre canlılığı, migrasyonu, invazyonu ve tümör belirteçlerinin ifadesine etkileri incelenerek vitamin D/UCA1 yolağının hastalık patogenezinin hangi yönde etkileyeceği tespit edilebilir.

Hastalık oluştuğunda MM'nin tipik semptomlarından birisi olarak görülen hiperkalseminin, vitamin D metabolizmasında görev alan CYP27B1 gibi kilit enzimlerin aktivitesini baskıladığı bilinmektedir (Bilir vd., 2022). Bu durum, vitamin D takviyesi uygulansa bile hastalarda aktif vitamin D'den istifade edilememesi anlamına gelmektedir. Zoledronik asit ve pamidronat gibi hiperkalsemi önleyici bifosfonat ilaçların vitamin D ile birlikte uygulanması, yaşanan problemi ortadan kaldırma potansiyeli taşımaktadır.

Vitamin D takviyesinin, MM hastalarında tedaviye bağlı toksisiteleri hafifletme ve tedavi etkinliğini artırma potansiyeli bulunmaktadır. Özellikle, yüksek vitamin D reseptörü (VDR) ekspresyonunun, MM hücrelerinin anti-CD38 antikörlerine karşı duyarlılığını artırabileceği bulunmuştur (Mirhosseini vd., 2023). Bu, yeni MM tedavi stratejilerinde vitamin D'nin yardımcı bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Mevcut literatür, vitamin D takviyesinin MM tedavisinde potansiyel faydalarını desteklemektedir. Ancak, dozaj stratejileri ve uzun vadeli etkiler hakkında daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

MM'li bireylerde görülen vitamin D eksikliğinin, hastalığın sonucu olarak mı ortaya çıktığı veya hastalık öncesinde mi meydana geldiği bilinmemektedir. Bu noktada hücre kültürü ve hayvan modelleri ile yapılacak deneysel çalışmalarla MM'ye zemin hazırlayan mutasyonların birikimini teşvik edici koşullar altında vitamin D'nin mutasyonlarının birikimini önleyici veya yavaşlatıcı etkisi olup olmadığı araştırılmalıdır. Popülasyonda vitamin D seviyesi normal ve yetersiz olan bireylerin uzun süreli takibi ile de vitamin D'nin MM'nin gelişim sürecindeki rolü aydınlatılabilir. Bu çalışmalardan elde edilecek bulgular, önemi gün geçtikçe daha çok anlaşılan vitamin D'nin sadece hasta bireylerde değil, kanser ve diğer hastalıkların önlenmesi amacıyla sağlıklı bireylerde de kullanımının gerekliliğini ortaya koyacaktır.

KAYNAKLAR

- Abdel-Hady, H., Yahia, S., Megahed, A., Mosbah, A., Seif, B., Nageh, E., Bhattacharjee, I., & Aly, H. (2019). Mediators in preterm infants with late-onset sepsis: a randomized controlled trial. *Journal of Pediatric Gastroenterology And Nutrition*, 68(4), 578-584.
- Ali, M. M., & Vaidya, V. (2007). Vitamin D and cancer. *Journal of Cancer Research And Therapeutics*, 3(4), 225-230.
- Amodio, N., D'Aquila, P., Passarino, G., Tassone, P., & Bellizzi, D. (2017). Epigenetic modifications in multiple myeloma: recent advances on the role of DNA and histone methylation. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 21(1), 91-101.
- Andrews, S., Kabrah, S., May, J., Donaldson, C., & Morse, H. (2013). Multiple myeloma: the bone marrow microenvironment and its relation to treatment. *British Journal of Biomedical Science*, 70(3), 110-120.
- Aru, B., Pehlivanoğlu, C., Dal, Z., Dereli-Çalışkan, N. N., Gürlü, E., & Yanıkkaya-Demirel, G. (2023). A potential area of use for immune checkpoint inhibitors: Targeting bone marrow microenvironment in acute myeloid leukemia. *Frontiers in Immunology*, 14, 1108200.
- Bai, X., Zheng, L., Xu, Y., Liang, Y., & Li, D. (2022). Role of microRNA-34b-5p in cancer and injury: how does it work? *Cancer Cell International*, 22(1), 381.
- Bailey, R., Cooper, J. D., Zeitels, L., Smyth, D. J., Yang, J. H., Walker, N. M., Hypponen, E., Dunger, D. B., Ramos-Lopez, E., & Badenhop, K. (2007). Association of the vitamin D metabolism gene CYP27B1 with type 1 diabetes. *Diabetes*, 56(10), 2616-2621.
- Barajas Ordonez, F., Wolleschak, D., Zeller, Y., Hinnerichs, M., Rodríguez-Feria, P., Aghayev, A., Mikusko, M., Borggreffe, J., Mougiakakos, D., & Surov, A. (2024). Parameters of body composition do not predict survival in patients with multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation. *Leukemia & Lymphoma*, 1-8.
- Barwick, B. G., Gupta, V. A., Vertino, P. M., & Boise, L. H. (2019). Cell of origin and genetic alterations in the pathogenesis of multiple myeloma. *Frontiers in Immunology*, 10, 1121.
- Becker, N. (2011). Epidemiology of multiple myeloma. *Multiple Myeloma*, 25-35.
- Beksac, M., Eikema, D.-J., Koster, L., Hulin, C., Poiré, X., Hamladji, R.-M., Gromek, T., Bazarbachi, A., Ozkurt, Z. N., & Pabst, T. (2024). In the era of Bortezomib-based Induction, intensification of Melphalan-based conditioning with Bortezomib does not improve Survival Outcomes in newly diagnosed Multiple Myeloma: a study from the Chronic Malignancies Working Party of the EBMT. *Bone Marrow Transplantation*, 59(4), 526.

- Belete, M. A., Tadesse, S., Tilahun, M., Gedefie, A., Shibabaw, A., Mulatie, Z., Wudu, M. A., Gebremichael, S., Debash, H., & Alebachew, M. (2024). Long noncoding RNAs and circular RNAs as potential diagnostic biomarkers of inflammatory bowel diseases: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Immunology*, 15, 1362437.
- Benedik, E. (2021). Sources of vitamin D for humans. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*.
- Bikle, D. D. (2021). Vitamin D regulation of and by long non coding RNAs. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 532, 111317.
- Bilir, Y., Bilir, A., Saraçoğlu, A., Çiyiltepe, F., Bombacı, E., Saraçoğlu, K. T., & Demirhan, R. (2022). Does Vitamin D Supplementation Reduce Cytokine Storm and Mortality in Geriatric Intensive Care Patients Diagnosed with COVID-19. *Journal of Contemporary Medicine*, 12(2), 233-237.
- Binkley, N., Ramamurthy, R., & Krueger, D. (2010). Low vitamin D status: definition, prevalence, consequences, and correction. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, 39(2), 287-301.
- Bintintan, V. V. (2018). Vitamin D as a potential therapeutic target and prognostic marker for colorectal cancer. *EBioMedicine*, 31, 11-12.
- Blasiak, J., Chojnacki, J., Pawlowska, E., Jablkowska, A., & Chojnacki, C. (2022). Vitamin D may protect against breast cancer through the regulation of long noncoding RNAs by VDR signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3189.
- Bruzeau, C., Pollet, J., Thomas, M., Ba, Z., Roulois, D., Pinaud, E., & Le Noir, S. (2023). Core enhancers of the 3'RR optimize IgH nuclear position and loop conformation for oriented CSR. *BioRxiv*, 2023.2007. 2011.548507.
- Cai, L., Tu, L., Li, T., Yang, X., Ren, Y., Gu, R., Zhang, Q., Yao, H., Qu, X., & Wang, Q. (2019). Downregulation of lncRNA UCA1 ameliorates the damage of dopaminergic neurons, reduces oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease through the inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway. *International Immunopharmacology*, 75, 105734.
- Caprio, C., Sacco, A., Giustini, V., & Roccaro, A. M. (2020). Epigenetic aberrations in multiple myeloma. *Cancers*, 12(10), 2996.
- Carlberg, C. (2022). Vitamin D and Its Target Genes. *Nutrients*, 14(7).
- Carlberg, C., Seuter, S., & Heikkinen, S. (2012). The first genome-wide view of vitamin D receptor locations and their mechanistic implications. *Anticancer Research*, 32(1), 271-282.
- Castañeda-Avila, M. A., Suárez-Ramos, T., Torres-Cintrón, C. R., Epstein, M. M., Gierbolini-Bermúdez, A., Tortolero-Luna, G., & Ortiz-Ortiz, K. J. (2024).

- Multiple myeloma incidence, mortality, and survival differences at the intersection of sex, age, and race/ethnicity: A comparison between Puerto Rico and the United States SEER population. *Cancer Epidemiology*, 89, 102537.
- Chen, D., Yang, X., Liu, M., Zhang, Z., & Xing, E. (2021). Roles of miRNA dysregulation in the pathogenesis of multiple myeloma. *Cancer Gene Therapy*, 28(12), 1256-1268.
- Chen, T., Sun, Z., Cui, Y., Ji, J., Li, Y., & Qu, X. (2023). Identification of long noncoding RNA NEAT1 as a key gene involved in the extramedullary disease of multiple myeloma by bioinformatics analysis. *Hematology*, 28(1), 2164449.
- Christakos, S., Ajibade, D. V., Dhawan, P., Fechner, A. J., & Mady, L. J. (2012). Vitamin D: metabolism. *Rheumatic Disease Clinics*, 38(1), 1-11.
- Cui, Z., Castagna, F., Hanif, W., Apple, S. J., Zhang, L., Tauras, J. M., Braunschweig, I., Kaur, G., Janakiram, M., & Wang, Y. (2023). Global longitudinal strain is associated with mortality in patients with multiple myeloma. *Journal of Clinical Medicine*, 12(7), 2595.
- Darmadi, D., Chugaeva, U. Y., Saleh, R. O., Hjazi, A., Saleem, H. M., Ghildiyal, P., Alwaily, E. R., Alawadi, A., Alnajjar, M. J., & Ihsan, A. (2024). Critical roles of long noncoding RNA H19 in cancer. *Cell Biochemistry and Function*, 42(3), e4018.
- Das, S., Juliana, N., Yazit, N. A. A., Azmani, S., & Abu, I. F. (2022). Multiple myeloma: challenges encountered and future options for better treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1649.
- Davis, L. N., & Sherbenou, D. W. (2021). Emerging therapeutic strategies to overcome drug resistance in multiple myeloma. *Cancers*, 13(7), 1686.
- Dhawan, P., Weider, R., & Christakos, S. (2009). CCAAT enhancer-binding protein α is a molecular target of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 in MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 284(5), 3086-3095.
- Díaz-Tejedor, A., Lorenzo-Mohamed, M., Puig, N., García-Sanz, R., Mateos, M.-V., Garayoa, M., & Paíno, T. (2021). Immune system alterations in multiple myeloma: molecular mechanisms and therapeutic strategies to reverse immunosuppression. *Cancers*, 13(6), 1353.
- Dong, P., Xiong, Y., Yue, J., Hanley, S. J., Kobayashi, N., Todo, Y., & Watari, H. (2018). Long non-coding RNA NEAT1: a novel target for diagnosis and therapy in human tumors. *Frontiers in Genetics*, 9, 471.
- Dragomir, M., Călugăru, O.-T., Popescu, B., Jordan, C., Jordan, D., Popescu, M., Aposteanu, S., Bădeliță, S., Nedelcu, G., & Șerban, C. (2024). DNA Sequencing of CD138 Cell Population Reveals TP53 and RAS-MAPK Mutations in Multiple Myeloma at Diagnosis. *Cancers*, 16(2), 358.

- Fan, W., Peng, Y., Liang, Z., Yang, Y., & Zhang, J. (2019). A negative feedback loop of H19/miR-675/EGR1 is involved in diabetic nephropathy by downregulating the expression of the vitamin D receptor. *Journal of Cellular Physiology*, 234(10), 17505-17513.
- Ferrer, J., & Dimitrova, N. (2024). Transcription regulation by long non-coding RNAs: mechanisms and disease relevance. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 1-20.
- Filippi, L., Ferrari, C., Nuvoli, S., Bianconi, F., Donner, D., Marongiu, A., Mammucci, P., Vultaggio, V., Chierichetti, F., & Rubini, G. (2024). Pet-radiomics in lymphoma and multiple myeloma: update of current literature. *Clinical and Translational Imaging*, 12(2), 119-135.
- Forster, S., Radpour, R., & Ochsenbein, A. F. (2023). Molecular and immunological mechanisms of clonal evolution in multiple myeloma. *Frontiers in Immunology*, 14, 1243997.
- Furukawa, Y., & Kikuchi, J. (2016). Epigenetic mechanisms of cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma. *International Journal of Hematology*, 104, 281-292.
- Gabory, A., Jammes, H., & Dandolo, L. (2010). The H19 locus: role of an imprinted non-coding RNA in growth and development. *Bioessays*, 32(6), 473-480.
- Garcia-Ortiz, A., Rodriguez-Garcia, Y., Encinas, J., Maroto-Martin, E., Castellano, E., Teixidó, J., & Martinez-Lopez, J. (2021). The role of tumor microenvironment in multiple myeloma development and progression. *Cancers*, 13(2), 217.
- Ghasemian, M., Zehtabi, M., Dari, M. A. G., Pour, F. K., Tabesh, G. A., Moramezi, F., Jafari, R. M., Barati, M., Uddin, S., & Farzaneh, M. (2024). The emerging roles of long non-coding RNA (lncRNA) H19 in gynecologic cancers. *BMC Cancer*, 24(1), 4.
- Giammanco, M., Di Majo, D., La Guardia, M., Aiello, S., Crescimannno, M., Flandina, C., Tumminello, F. M., & Leto, G. (2015). Vitamin D in cancer chemoprevention. *Pharmaceutical Biology*, 53(10), 1399-1434.
- Gkotinakou, I.-M., Kechagia, E., Pazaitou-Panayiotou, K., Mylonis, I., Liakos, P., & Tsakalof, A. (2020). Calcitriol suppresses HIF-1 and HIF-2 transcriptional activity by reducing HIF-1/2 α protein levels via a VDR-independent mechanism. *Cells*, 9(11), 2440.
- Graklanov, V., Popov, V., & Raycheva, R. (2020). Serum levels of vitamin D in patients with multiple myeloma. *Folia Medica*, 62(4), 730-735.
- Grants, J. M., May, C., Bridgers, J., Huang, S., Gillis, S., Meissner, B., Boyle, M., Ben-Neriah, S., Hung, S., & Duns, G. (2024). Chronic lymphocytic leukemia IGHV somatic hypermutation detection by targeted capture next-generation sequencing. *Clinical Chemistry*, 70(1), 273-284.

- Gregorova, J., Vychytilova-Faltejskova, P., & Sevcikova, S. (2021). Epigenetic regulation of MicroRNA clusters and families during tumor development. *Cancers*, 13(6), 1333.
- Grigaite, R., Iles, J. K., Harding, S., Patel, R., Wallis, G., & Iles, R. K. (2023). Degree of immunoglobulin kappa light chain glycosylation of anti-spike SARS CoV-2 antibodies correlates with COVID-19 severity. *MedRxiv*, 2023.2001.2006.23284259.
- Gunton, J. E., & Girgis, C. M. (2018). Vitamin D and muscle. *Bone Reports*, 8, 163-167.
- Guo, F., Tang, C., Huang, B., Gu, L., Zhou, J., Mo, Z., Liu, C., & Liu, Y. (2022). LncRNA H19 drives proliferation of cardiac fibroblasts and collagen production via suppression of the miR-29a-3p/miR-29b-3p-VEGFA/TGF- β axis. *Molecules and Cells*, 45(3), 122-133.
- Guoqin, W., Qiuwen, Y., Shujuan, N., Zhuangqing, Y., Yunlan, C., Zhang, L., Huang, Y., Fujia, X., Cheng, X., & Junlin, C. (2021). LncRNA MEG3 promotes endoplasmic reticulum stress and suppresses proliferation and invasion of colorectal carcinoma cells through the MEG3/miR-103a-3p/PDHB ceRNA pathway. *Neoplasia*, 68(2).
- Han, P., & Chang, C.-P. (2015). Long non-coding RNA and chromatin remodeling. *RNA Biology*, 12(10), 1094-1098.
- Hardy, R. R., & Hayakawa, K. (2001). B cell development pathways. *Annual Review of Immunology*, 19(1), 595-621.
- Hark, A. T., & Tilghman, S. M. (1998). Chromatin conformation of the H19 epigenetic mark. *Human Molecular Genetics*, 7(12), 1979-1985.
- Hauptman, N., & Glavač, D. (2013). Long non-coding RNA in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 4655-4669.
- Henry, H. L. (2011). Regulation of vitamin D metabolism. *Best practice & research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 25(4), 531-541.
- Hewison, M. (2012). An update on vitamin D and human immunity. *Clinical Endocrinology*, 76(3), 315-325.
- Ho, M., Patel, A., Goh, C. Y., Moscvin, M., Zhang, L., & Bianchi, G. (2020). Changing paradigms in diagnosis and treatment of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM). *Leukemia*, 34(12), 3111-3125.
- Hosseini, N. F., Manoochehri, H., Khoei, S. G., & Sheykhasan, M. (2021). The functional role of long non-coding RNA UCA1 in human multiple cancers: a review study. *Current Molecular Medicine*, 21(2), 96-110.

- Iriani, A., Rachman, A., Fatina, M. K., Gemilang, R. K., & Trisnandi, A. (2024). Gene expression profiling of vitamin D metabolism enzymes in leukemia and lymphoma patients: molecular aspect interplay of VDR, CYP2R1, and CYP24A1. *Molecular Biology Reports*, 51(1), 1-9.
- Ismail, N. H., Mussa, A., Al-Khreisat, M. J., Mohamed Yusoff, S., Husin, A., Johan, M. F., & Islam, M. A. (2023). The Global Prevalence of Vitamin D Deficiency and Insufficiency in Patients with Multiple Myeloma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, 15(14).
- Isnard, P., Benichou, N., Sibon, D., Rinsant, A., Goujon, J.-M., Touchard, G., Ory, C., Kaaki, S., Colombat, M., & Ferreira, L. D. S. (2023). Randall-Type Monoclonal IgE Kappa Light-Heavy Chain Deposition Disease. *Kidney International Reports*, 8(7), 1464-1468.
- Jayaweera, S. P. E., Wanigasinghe Kanakanamge, S. P., Rajalingam, D., & Silva, G. N. (2021). Carfilzomib: a promising proteasome inhibitor for the treatment of relapsed and refractory multiple myeloma. *Frontiers in Oncology*, 11, 740796.
- Jiang, S., & Guo, Y. (2020). Epigenetic clock: DNA methylation in aging. *Stem Cells International*, 2020.
- Kaiser, M. F., Heider, U., Mieth, M., Zang, C., von Metzler, I., & Sezer, O. (2013). The proteasome inhibitor bortezomib stimulates osteoblastic differentiation of human osteoblast precursors via upregulation of vitamin D receptor signalling. *European Journal of Haematology*, 90(4), 263-272.
- Kaur, R., McGarry, A., Shropshire, J. D., Leigh, B. A., & Bordenstein, S. R. (2024). Prophage proteins alter long noncoding RNA and DNA of developing sperm to induce a paternal-effect lethality. *Science*, 383(6687), 1111-1117.
- Kazimierczyk, M., Kasproicz, M. K., Kasprzyk, M. E., & Wrzesinski, J. (2020). Human long noncoding RNA interactome: detection, characterization and function. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 1027.
- Khalafizadeh, A., Hashemizadegan, S. D., Shokri, F., Bakhshinejad, B., Jabbari, K., Motavaf, M., & Babashah, S. (2024). Competitive endogenous RNA networks: Decoding the role of long non-coding RNAs and circular RNAs in colorectal cancer chemoresistance. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 28(7), e18197.
- Khan, Q. J., & Fabian, C. J. (2010). How I treat vitamin d deficiency. *Journal of Oncology Practice*, 6(2), 97-101.
- Khan, S., Masood, M., Gaur, H., Ahmad, S., & Syed, M. A. (2021). Long non-coding RNA: an immune cells perspective. *Life Sciences*, 271, 119152.
- Kondratyeva, E. I., Zakharova, I. N., Ilenkova, N. A., Klimov, L. Y., Petrova, N. V., Zodbinova, A. E., Zhekaite, E. K., Chikunov, V. V., Dolbnya, S. V., &

- Voronkova, A. Y. (2020). Vitamin D status in Russian children and adolescents: contribution of genetic and exogenous factors. *Frontiers in Pediatrics*, 8, 583206.
- Korucu, E. N., & Unlu, A. (2022). Effects of vitamin D on proliferation, invasion and energy metabolism of MCF-7 breast cancer cell line. *Istanbul Journal of Pharmacy*, 52(3), 311-317.
- Kulda, V. (2012). Vitamin D metabolism. *Vnitřní Lekarství*, 58(5), 400-404.
- Lewandowski, J. P., Dumbović, G., Watson, A. R., Hwang, T., Jacobs-Palmer, E., Chang, N., Much, C., Turner, K. M., Kirby, C., & Rubinstein, N. D. (2020). The Tug1 lncRNA locus is essential for male fertility. *Genome Biology*, 21, 1-35.
- Li, J.-L., Liu, X.-L., Guo, S.-F., Yang, Y., Zhu, Y.-L., & Li, J.-Z. (2019). Long noncoding RNA UCA1 regulates proliferation and apoptosis in multiple myeloma by targeting miR-331-3p/IL6R axis for the activation of JAK2/STAT3 pathway. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 23(21).
- Li, J., Wang, M., & Chen, X. (2020). Long non-coding RNA UCA1 modulates cell proliferation and apoptosis by regulating miR-296-3p/Myc axis in acute myeloid leukemia. *Cell Cycle*, 19(12), 1454-1465.
- Li, Y., Ma, H.-Y., Hu, X.-W., Qu, Y.-Y., Wen, X., Zhang, Y., & Xu, Q.-Y. (2020). LncRNA H19 promotes triple-negative breast cancer cells invasion and metastasis through the p53/TNFAIP8 pathway. *Cancer Cell International*, 20, 1-14.
- Li, Y., Syed, J., & Sugiyama, H. (2016). RNA-DNA triplex formation by long noncoding RNAs. *Cell Chemical Biology*, 23(11), 1325-1333.
- Li, Z., Yu, D., Li, H., Lv, Y., & Li, S. (2024). [Corrigendum] Long non-coding RNA UCA1 confers tamoxifen resistance in breast cancer endocrinotherapy through regulation of the EZH2/p21 axis and the PI3K/AKT signaling pathway. *International Journal of Oncology*, 64(3), 1-1.
- Lian, J. B., Stein, J. L., Stein, G. S., Montecino, M., Van Wijnen, A. J., Javed, A., & Gutierrez, S. (2001). Contributions of nuclear architecture and chromatin to vitamin D-dependent transcriptional control of the rat osteocalcin gene. *Steroids*, 66(3-5), 159-170.
- Lin, C.-P., & He, L. (2017). Noncoding RNAs in cancer development. *Annual Review of Cancer Biology*, 1, 163-184.
- Lin, P.-C., Huang, H.-D., Chang, C.-C., Chang, Y.-S., Yen, J.-C., Lee, C.-C., Chang, W.-H., Liu, T.-C., & Chang, J.-G. (2016). Long noncoding RNA TUG1 is downregulated in non-small cell lung cancer and can regulate CELF1 on binding to PRC2. *BMC Cancer*, 16, 1-10.
- Lio, C.-W. J., Yuita, H., & Rao, A. (2019). Dysregulation of the TET family of epigenetic regulators in lymphoid and myeloid malignancies. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 134(18), 1487-1497.

- Louro, R., Smirnova, A. S., & Verjovski-Almeida, S. (2009). Long intronic noncoding RNA transcription: expression noise or expression choice? *Genomics*, 93(4), 291-298.
- Lu, G., Wu, Z., Shang, J., Xie, Z., & Chen, C. (2021). The effects of metformin on autophagy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 137, 111286.
- Lu, M., Hu, Y., Wu, Y., Zhou, H., Jian, Y., Tian, Y., & Chen, W. (2019). Genome-wide discovery and characterization of long noncoding RNAs in patients with multiple myeloma. *BMC Medical Genomics*, 12, 1-16.
- Ma, L., Bajic, V. B., & Zhang, Z. (2013). On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biology*, 10(6), 924-933.
- Mao, J., Chen, R., Xue, L., Zhu, Y., Zhao, L., & Wang, J. (2024). Metformin and chidamide synergistically suppress multiple myeloma progression and enhance lenalidomide/bortezomib sensitivity. *Environmental Toxicology*.
- Michels, T. C., & Petersen, K. E. (2017). Multiple myeloma: diagnosis and treatment. *American Family Physician*, 95(6), 373-383A.
- Mirhosseini, N., Psihogios, A., McLaren, M. D., & Seely, D. (2023). Vitamin D and multiple myeloma: A scoping review. *Current Oncology*, 30(3), 3263-3276.
- Mofers, A., Selvaraju, K., Gubat, J., D'Arcy, P., & Linder, S. (2020). Identification of proteasome inhibitors using analysis of gene expression profiles. *European Journal of Pharmacology*, 889, 173709.
- Mohan, S., Holte, P. K., Yuan, B. J., Sems, S. A., & Kearns, A. E. (2020). MON-394 Vitamin D Levels and Functional Recovery Following Hip Fracture. *Journal of the Endocrine Society*, 4(Supplement_1), MON-394.
- Morelli, E., Gullà, A., Rocca, R., Federico, C., Raimondi, L., Malvestiti, S., Agosti, V., Rossi, M., Costa, G., & Giavaresi, G. (2020). The non-coding RNA landscape of plasma cell dyscrasias. *Cancers*, 12(2), 320.
- Morris, E. V., & Edwards, C. M. (2019). Bone marrow adiposity and multiple myeloma. *Bone*, 118, 42-46.
- Nau, K. C., & Lewis, W. D. (2008). Multiple myeloma: diagnosis and treatment. *American Family Physician*, 78(7), 853-859.
- Pan, J. X., Chen, T. N., Ma, K., Wang, S., Yang, C. Y., & Cui, G. Y. (2020). A negative feedback loop of H19/miR-675/VDR mediates therapeutic effect of curcumin in the treatment of glioma. *Journal of Cellular Physiology*, 235(3), 2171-2182.
- Park, M. K., Zhang, L., Min, K.-W., Cho, J.-H., Yeh, C.-C., Moon, H., Hormaechea-Agulla, D., Mun, H., Ko, S., & Lee, J. W. (2021). NEAT1 is essential for metabolic changes that promote breast cancer growth and metastasis. *Cell Metabolism*, 33(12), 2380-2397. e2389.

- Park, W. H., Seol, J. G., Kim, E. S., Binderup, L., Koeffler, H. P., Kim, B. K., & Lee, Y. Y. (2002). The induction of apoptosis by a combined 1, 25 (OH) 2D3 analog, EB1089 and TGF- β 1 in NCI-H929 multiple myeloma cells. *International Journal of Oncology*, 20(3), 533-542.
- Park, W. H., Seol, J. G., Kim, E. S., Hyun, J. M., Jung, C. W., Lee, C. C., Binderup, L., Koeffler, H. P., Kim, B. K., & Lee, Y. Y. (2000). Induction of apoptosis by vitamin D3 analogue EB1089 in NCI-H929 myeloma cells via activation of caspase 3 and p38 MAP kinase. *British Journal of Haematology*, 109(3), 576-583.
- Peng, X., Gao, H., Xu, R., Wang, H., Mei, J., & Liu, C. (2020). The interplay between HIF-1 α and noncoding RNAs in cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 39, 1-19.
- Peng, Y., Li, F., Zhang, P., Wang, X., Shen, Y., Feng, Y., Jia, Y., Zhang, R., Hu, J., & He, A. (2020). IGF-1 promotes multiple myeloma progression through PI3K/Akt-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Life Sciences*, 249, 117503.
- Pieper, K., Grimbacher, B., & Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(4), 959-971.
- Pike, J. W., & Meyer, M. B. (2014). Fundamentals of vitamin D hormone-regulated gene expression. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 144, 5-11.
- Pike, J. W., Meyer, M. B., & Bishop, K. A. (2012). Regulation of target gene expression by the vitamin D receptor-an update on mechanisms. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 13, 45-55.
- Rajkumar, S. V., Dimopoulos, M. A., Palumbo, A., Blade, J., Merlini, G., Mateos, M.-V., Kumar, S., Hillengass, J., Kastiris, E., & Richardson, P. (2014). International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The Lancet Oncology*, 15(12), e538-e548.
- Rajkumar, S. V., & Kumar, S. (2016). Multiple myeloma: diagnosis and treatment. *Mayo Clinic Proceedings*,
- Ramagopalan, S. V., Heger, A., Berlanga, A. J., Maugeri, N. J., Lincoln, M. R., Burrell, A., Handunnetthi, L., Handel, A. E., Disanto, G., & Orton, S.-M. (2010). A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution. *Genome Research*, 20(10), 1352-1360.
- Ramli, S., Sim, M. S., Guad, R. M., Gopinath, S. C. B., Subramaniyan, V., Fuloria, S., Fuloria, N. K., Choy, K. W., Rana, S., & Wu, Y. S. (2021). Long noncoding RNA UCA1 in gastrointestinal cancers: molecular regulatory roles and patterns, mechanisms, and interactions. *Journal of Oncology*, 2021, 1-15.
- Raval-Pandya, M., Dhawan, P., Barletta, F., & Christakos, S. (2001). YY1 represses vitamin D receptor-mediated 25-hydroxyvitamin D3 24-hydroxylase

transcription: relief of repression by CREB-binding protein. *Molecular Endocrinology*, 15(6), 1035-1046.

Ridani, J., Barbulescu, P., Martin, A., & Di Noia, J. M. (2024). Somatic Hypermutation. In *Molecular Biology of B Cells* (pp. 235-256). Elsevier.

Rinke, J., Chase, A., Cross, N. C., Hochhaus, A., & Ernst, T. (2020). EZH2 in myeloid malignancies. *Cells*, 9(7), 1639.

Rivera, C. E., Zhou, Y., Chupp, D. P., Yan, H., Fisher, A. D., Simon, R., Zan, H., Xu, Z., & Casali, P. (2023). Intrinsic B cell TLR-BCR linked coengagement induces class-switched, hypermutated, neutralizing antibody responses in absence of T cells. *Science Advances*, 9(17), eade8928.

Rø, T. B., Holien, T., Fagerli, U.-M., Hov, H., Misund, K., Waage, A., Sundan, A., Holt, R. U., & Børset, M. (2013). HGF and IGF-1 synergize with SDF-1 α in promoting migration of myeloma cells by cooperative activation of p21-activated kinase. *Experimental Hematology*, 41(7), 646-655.

Rojas, E. A., Corchete, L. A., De Ramón, C., Krzeminski, P., Quwaider, D., García-Sanz, R., Martínez-López, J., Oriol, A., Rosiñol, L., & Bladé, J. (2022). Expression of p53 protein isoforms predicts survival in patients with multiple myeloma. *American Journal of Hematology*, 97(6), 700-710.

Saleh, R. O., Alkhafaji, A. T., Mohammed, J. S., Bansal, P., Kaur, H., Ahmad, I., Hjazi, A., Mohammed, I. H., Jawad, M. A., & Zwamel, A. H. (2024). LncRNA NEAT1 in the pathogenesis of liver-related diseases. *Cell Biochemistry and Function*, 42(3), e4006.

Saponaro, F., Saba, A., & Zucchi, R. (2020). An update on vitamin D metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6573.

Sari, E., Oztay, F., & Tasci, A. E. (2020). Vitamin D modulates E-cadherin turnover by regulating TGF- β and Wnt signalings during EMT-mediated myofibroblast differentiation in A459 cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 202, 105723.

Schreiner, S., Berghaus, N., Poos, A. M., Raab, M. S., Besemer, B., Fenk, R., Goldschmidt, H., Mai, E. K., Müller-Tidow, C., & Weinhold, N. (2024). Sequence diversity of kappa light chains from patients with AL amyloidosis and multiple myeloma. *Amyloid*, 1-9.

Sellers, Z. P., Schneider, G., Maj, M., & Ratajczak, M. Z. (2018). Analysis of the paternally-imprinted DLK1–MEG3 and IGF2–H19 tandem gene loci in NT2 embryonal carcinoma cells identifies DLK1 as a potential therapeutic target. *Stem Cell Reviews and Reports*, 14, 823-836.

Shaker, O. G., Safa, A., Khairy, A., & Abozeid, N. F. (2023). Serum long noncoding RNA H19/micro RNA-675-5p axis as a probable diagnostic biomarker in inflammatory bowel disease. *Molecular Biology Reports*, 50(11), 9029-9036.

- Shen, X., Bai, H., Zhu, H., Yan, Q., Yang, Y., Yu, W., Shi, Q., Wang, J., Li, J., & Chen, L. (2018). Long non-coding RNA MEG3 functions as a competing endogenous RNA to regulate HOXA11 expression by sponging miR-181a in multiple myeloma. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 49(1), 87-100.
- Sun, H., Peng, G., Wu, H., Liu, M., Mao, G., Ning, X., Yang, H., & Deng, J. (2020). Long non-coding RNA MEG3 is involved in osteogenic differentiation and bone diseases. *Biomedical Reports*, 13(1), 15-21.
- Sun, Y., Pan, J., Zhang, N., Wei, W., Yu, S., & Ai, L. (2017). Knockdown of long non-coding RNA H19 inhibits multiple myeloma cell growth via NF- κ B pathway. *Scientific Reports*, 7(1), 18079.
- Taiana, E., Favasuli, V., Ronchetti, D., Todoerti, K., Pelizzoni, F., Manzoni, M., Barbieri, M., Fabris, S., Silvestris, I., & Gallo Cantafio, M. E. (2020). Long non-coding RNA NEAT1 targeting impairs the DNA repair machinery and triggers anti-tumor activity in multiple myeloma. *Leukemia*, 34(1), 234-244.
- Tang, S., Cheng, B., Zhe, N., Ma, D., Xu, J., Li, X., Guo, Y., Wu, W., & Wang, J. (2018). Histone deacetylase inhibitor BG45-mediated HO-1 expression induces apoptosis of multiple myeloma cells by the JAK2/STAT3 pathway. *Anti-Cancer Drugs*, 29(1), 61-74.
- Tao, S., Cao, P., Jin, M., Suo, P., Chen, Y., & Li, Y. (2024). Integrated analysis of long non-coding RNAs and mRNAs associated with condyloma acuminatum. *The Journal of Dermatology*.
- Thankachan, S., Bhardwaj, B. K., Venkatesh, T., & Suresh, P. S. (2021). Long non-coding RNA NEAT1 as an emerging biomarker in breast and gynecologic cancers: a systematic overview. *Reproductive Sciences*, 28, 2436-2447.
- Trtkova, K. S., Frybortova, V., Luzna, P., Drozdkova, D. H., Krhovska, P., Proskova, J., Joehrer, K., & Minarik, J. (2019). Downregulation of methylation and demethylation enzymes in unsorted cell population of multiple myeloma patients. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, 19(10), e134-e135.
- Tuo, Y., Li, X., & Luo, J. (2015). Long noncoding RNA UCA1 modulates breast cancer cell growth and apoptosis through decreasing tumor suppressive miR-143. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 19(18), 3403-3411.
- Uwitonze, A. M., Rahman, S., Ojeh, N., Grant, W. B., Kaur, H., Haq, A., & Razzaque, M. S. (2020). Oral manifestations of magnesium and vitamin D inadequacy. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 200, 105636.
- van Eyk, A. D. (2015). The effect of five artificial sweeteners on Caco-2, HT-29 and HEK-293 cells. *Drug and Chemical Toxicology*, 38(3), 318-327.
- Wang, H., Guan, Z., He, K., Qian, J., Cao, J., & Teng, L. (2017). LncRNA UCA1 in anti-cancer drug resistance. *Oncotarget*, 8(38), 64638.

- Wang, P., Wang, Z., Liu, G., Jin, C., Zhang, Q., Man, S., & Wang, Z. (2019). miR-657 promotes macrophage polarization toward M1 by targeting FAM46C in gestational diabetes mellitus. *Mediators of Inflammation*, 2019.
- Wierzbicka, A., Pawlina-Tyszko, K., Świątkiewicz, M., Szmatoła, T., & Oczkiewicz, M. (2024). Changes in miRNA expression in the lungs of pigs supplemented with different levels and forms of vitamin D. *Molecular Biology Reports*, 51(1), 8.
- Wilusz, J. E., Sunwoo, H., & Spector, D. L. (2009). Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes & Development*, 23(13), 1494-1504.
- Xia, Y., Pei, T., Zhao, J., Wang, Z., Shen, Y., Yang, Y., & Liang, J. (2024). Long noncoding RNA H19: functions and mechanisms in regulating programmed cell death in cancer. *Cell Death Discovery*, 10(1), 76.
- Xiang, H., Tu, B., Luo, M., Hou, P., Wang, J., Zhang, R., & Wu, L. (2022). Knockdown of UCA1 attenuated the progression of alcoholic fatty disease by sponging miR-214. *Mammalian Genome*, 33(3), 534-542.
- Xu, J., Wang, X., Zhu, C., & Wang, K. (2022). A review of current evidence about lncRNA MEG3: A tumor suppressor in multiple cancers. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 997633.
- Xuan, W., Yu, H., Zhang, X., & Song, D. (2019). Crosstalk between the lnc RNA UCA1 and micro RNA s in cancer. *FEBS Letters*, 593(15), 1901-1914.
- Yang, C., Liang, Y., Shu, J., Wang, S., Hong, Y., Chen, K., & Sun, M. (2023). Long non-coding RNAs in multiple myeloma. *International Journal of Oncology*, 62(6), 1-16.
- Yang, J., Qi, M., Fei, X., Wang, X., & Wang, K. (2021). LncRNA H19: A novel oncogene in multiple cancers. *International Journal of Biological Sciences*, 17(12), 3188.
- Yang, T., Liu, X., Kumar, S. K., Jin, F., & Dai, Y. (2022). Decoding DNA methylation in epigenetics of multiple myeloma. *Blood Reviews*, 51, 100872.
- Yin, L., Grandi, N., Raum, E., Haug, U., Arndt, V., & Brenner, H. (2010). Meta-analysis: serum vitamin D and breast cancer risk. *European Journal of Cancer*, 46(12), 2196-2205.
- Yin, Q., Shen, X., Xu, H., Feng, W., Shi, X., & Ju, S. (2023). YY1-induced LncRNA-TUG1 elevates YOD1 to promote cell proliferation and inhibit bortezomib sensitivity in multiple myeloma. *Leukemia & Lymphoma*, 64(6), 1161-1174.
- Zang, X., Wang, J., Xia, Y., Li, J., Chen, L., Gu, Y., & Shen, X. (2022). LncRNA MEG3 promotes the sensitivity of bortezomib by inhibiting autophagy in multiple myeloma. *Leukemia Research*, 123, 106967.
- Zeng, W., Meng, F., Liu, Z., Mao, X., Luo, L., Zheng, M., Qin, S., Liu, W., Zhou, J., & Sun, H. (2014). Bortezomib-based chemotherapy regimens can improve response

in newly diagnosed multiple myeloma patients with bcl-2 and survivin overexpression. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(7), 4239.

Zhang, B., Sun, Y.-F., Zhang, X.-M., Jiang, N., & Chen, Q. (2020). TUG1 weakens the sensitivity of acute myeloid leukemia cells to cytarabine by regulating miR-655-3p/CCND1 axis. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 24(9).

Zhang, J., & Gao, Y. (2019). Long non-coding RNA MEG3 inhibits cervical cancer cell growth by promoting degradation of P-STAT3 protein via ubiquitination. *Cancer Cell International*, 19, 1-10.

Zhang, L., Zhao, F., Li, W., Song, G., Kasim, V., & Wu, S. (2022). The biological roles and molecular mechanisms of long non-coding RNA MEG3 in the hallmarks of cancer. *Cancers*, 14(24), 6032.

Zhang, X., Yang, L., & Xu, G. (2020). Silencing of long noncoding RNA TUG1 inhibits viability and promotes apoptosis of acute myeloid leukemia cells by targeting microRNA-221-3p/KIT axis. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 76(3), 425-437.

Zheng, J.-F., Guo, N.-H., Zi, F.-M., & Cheng, J. (2020). Long noncoding RNA H19 promotes tumorigenesis of multiple myeloma by activating BRD4 signaling by targeting microRNA 152-3p. *Molecular and Cellular Biology*, 40(3), e00382-00319.

Zhou, H., Sun, L., & Wan, F. (2019). Molecular mechanisms of TUG1 in the proliferation, apoptosis, migration and invasion of cancer cells. *Oncology Letters*, 18(5), 4393-4402.

Zhu, Y., Chen, P., Gao, Y., Ta, N., Zhang, Y., Cai, J., Zhao, Y., Liu, S., & Zheng, J. (2018). MEG3 activated by vitamin D inhibits colorectal cancer cells proliferation and migration via regulating clusterin. *EBioMedicine*, 30, 148-157.

Zhuang, W., Ge, X., Yang, S., Huang, M., Zhuang, W., Chen, P., Zhang, X., Fu, J., Qu, J., & Li, B. (2015). Upregulation of lncRNA MEG3 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from multiple myeloma patients by targeting BMP4 transcription. *Stem Cells*, 33(6), 1985-1997.

Zichittella, C., Loria, M., Celesia, A., Di Liberto, D., Corrado, C., Alessandro, R., Emanuele, S., & Conigliaro, A. (2023). Long non-coding RNA H19 enhances the pro-apoptotic activity of ITF2357 (a histone deacetylase inhibitor) in colorectal cancer cells. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1275833.

Zuo, S., Wu, L., Wang, Y., & Yuan, X. (2020). Long non-coding RNA MEG3 activated by vitamin D suppresses glycolysis in colorectal cancer via promoting c-Myc degradation. *Frontiers in Oncology*, 10, 274.