



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**



**MULTİPLE MYELOMA HASTALARINDA
lncRNA *LUNAR1* EKSPRESYON ANALİZİ**

Dr. Ezgi GÖKPINAR İLİ

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Timur TUNCALI**

**ANKARA
2020**



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**



**MULTİPLE MYELOMA HASTALARINDA
lncRNA *LUNAR1* EKSPRESYON ANALİZİ**

Dr. Ezgi GÖKPINAR İLİ

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Timur TUNCALI**

Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından
18B0230009 proje numarası ile desteklenmiştir.

**ANKARA
2020**

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	: Ezgi Gökpınar İli	Sınav tarihi: 22.01.2020
Anabilim/Bilim Dalı	: Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	
Tez Danışmanı	: Dr.Öğr. Üyesi Timur Tuncalı	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Tezin Başlığı: Multiple myeloma hastalarında lncRNA LUNARI ekspresyon analizi	
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☐ 1 ☒ 2 ☐ 3

III. KARAR	
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak	
☒ Kabulüne	
☐ Reddine	
☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine	
☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

IV. AÇIKLAMALAR	


Jüri Başkanı
Prof. Dr. Hatice Ilgin Ruhi
AÜTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı


Jüri Üyesi
Dr. Öğr. Üyesi Timur Tuncalı
AÜTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı


Jüri Üyesi
Prof. Dr. Zerrin Yılmaz Çelik
Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik
Anabilim Dalı

ÖNSÖZ

Multiple Myeloma (MM), post-germinal merkez B hücrelerden köken alan plazma hücrelerinin malignitesidir. MM, tüm hematolojik malignitelerin %10'unu oluşturur. Tedavi seçeneklerindeki gelişmelere rağmen MM halen önemli düzeyde morbidite ve mortalitesi olan bir hastalıktır. MM patogenezinin etki edebilecek birçok genetik ve epigenetik değişiklik tanımlanmıştır. Ancak MM'de uzun protein kodlamayan RNA'ların (lncRNA) etkisini araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır. MM hastalarında lncRNA *LUNAR1*'in ekspresyon düzeyini araştıran bu çalışmanın MM patogenezinde lncRNA'ların etkisi ile ilgili bilgi birikimine katkı sunacağını düşünmekteyiz.

2008'de tıp fakültesine başlamak ile yuvam haline gelen Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin en köklü bölümlerinden birisi olan Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimimi tamamlamanın gurur ve mutluluğunu yaşıyorum. Eğitim sürecime tüm katkıları nedeniyle değerli hocalarım Prof. Dr. Hatice Ilgın Ruhi, Dr. Öğr. Üyesi Timur Tuncalı, Dr. Öğr. Üyesi Halil G. Karabulut, Dr. Öğr. Üyesi Nüket Yürür Kutlay ve Öğr. Gör. Dr. Arzu Vicdan'a içtenlikle teşekkür ediyorum.

Tez çalışmamın her aşamasında değerli zamanını ve katkılarını esirgemeyen tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Timur Tuncalı ve yoğun laboratuvar çalışmaları sırasında bilgi ve deneyimlerini tevazu ile paylaşan Dr. Öğr. Üyesi Halil G. Karabulut hocalarıma,

Hasta örneklerinin toplanmasındaki desteklerinden dolayı başta Prof. Dr. Meral Bektaş, Prof. Dr. Meltem Yüksel ve Doç. Dr. Sinem Civriz Bozdağ olmak üzere AÜTF Hematoloji Bilim Dalı'na,

Bu tezi, 18B0230009 proje numarası ile destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü ve çalışanlarına,

Birlikte keyifle çalıştığım uzman ve asistan arkadaşlarım Sadiye Ekinci, Şule Altınar, Ceren Damla Durmaz, Mustafa Gökoğlu, Elifcan Taşdelen, İbrahim Kaplan, Yasemin Karaca, Hande Nur Cesur Baltacı ve Berna Sevim'e,

Uzmanlık eğitimim boyunca sağladıkları samimi ortam ve destekleri için AÜTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nın her bir çalışanına,

Denizi merak eden bir 'küçük kara balık' olmamın nedeni ve beni her koşulda destekleyen biricik annem Gülten, babam Ercan ve kardeşim Görkem'e,

Sevgisini ve desteğini her an hissettiğim hayat yoldaşım, sevgili eşim Volkan'a en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Ezgi Gökpınar İli

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Multiple Myeloma.....	3
2.1.1. Epidemiyoloji	3
2.1.2. Klinik Bulgular	4
2.1.3. Hastalık aşamaları ve sınıflandırma	6
2.1.4. Genetik Değişiklikler.....	8
2.1.5. Epigenetik Değişiklikler	11
2.1.6. Tümör mikroçevresi.....	12
2.2. Notch Yolağı	15
2.2.1. Notch yolağı ve multiple myeloma.....	17
2.3. Long non-coding RNA'lar.....	19
2.3.1. lncRNA sınıflandırması.....	20
2.3.2. Normal B hücre gelişimi ve lncRNA'lar.....	25
2.3.3. Multiple Myeloma ve lncRNA'lar.....	27
2.4. <i>LUNAR1</i>	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. Hasta seçimi ve örneklerin toplanması	32
3.1.1. Vaka grubu:.....	32
3.1.2. Kontrol Grubu:.....	32

3.1.3. Dâhil Olma/Olmama Kriterleri.....	32
3.2. Kemik iliği aspirasyon materyalinden CD138+ plazma hücrelerinin ayrılması	33
3.2.1. Kemik iliği mononükleer hücrelerin ayrılması	33
3.2.2. CD138+ plazma hücrelerinin ayrılması	34
3.3. Plazma hücrelerinden RNA izolasyonu.....	34
3.3.1. RNA İzolasyon Prosedürü:	34
3.4. cDNA Sentezi	35
3.5. Real-time reverse transkriptaz PCR.....	36
3.6. Sonuçların değerlendirilmesi ve istatistiksel analiz	37
3.6.1. Real time reverse transcriptase PCR analizi	37
3.6.2. İstatistiksel Analiz	38
4. BULGULAR.....	39
4.1. Hasta grubu	39
4.1.1. Hasta grubunun konvansiyonel ve moleküler sitogenetik bulguları.....	42
4.2. Kontrol grubu	43
4.3.1. Hasta grubunda <i>ACTB</i> ekspresyon çalışması.....	44
4.3.1. Kontrol grubunda <i>ACTB</i> ekspresyon çalışması	46
4.4.1. Hasta grubunda <i>LUNAR1</i> ekspresyon çalışması	47
4.4.2. Kontrol grubunda <i>LUNAR1</i> ekspresyon çalışması	50
4.5. Rölatif ekspresyonların gruplar arasında karşılaştırılması	51
5. TARTIŞMA.....	54
6. SONUÇLAR.....	57
ÖZET	58
SUMMARY.....	59

KAYNAKLAR DİZİNİ	60
------------------------	----



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<i>APH-1</i>	<i>anterior pharynx defective 1</i>
<i>APRIL (TNFSF13)</i>	<i>TNF superfamily member 13</i>
<i>BCMA (TNFRSF17)</i>	<i>TNF receptor superfamily member 17</i>
<i>BMP2</i>	<i>bone morphogenetic protein 2</i>
<i>BMP4</i>	<i>bone morphogenetic protein 4</i>
<i>BNIP3</i>	<i>BCL2 interacting protein 3</i>
<i>BRAF</i>	<i>B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
<i>CCAT1</i>	<i>colon cancer associated transcript 1</i>
<i>CCL3</i>	<i>C-C motif chemokine ligand 3</i>
<i>CCND1</i>	<i>cyclin D1</i>
<i>CCND3</i>	<i>cyclin D3</i>
<i>CCR1</i>	<i>C-C motif chemokine receptor 1</i>
<i>CDH1</i>	<i>cadherin 1</i>
<i>CDKN1A</i>	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i>
<i>CHD4</i>	<i>chromodomain helicase DNA binding protein 4</i>
<i>CRNDE</i>	<i>colorectal neoplasia differentially expressed</i>
<i>CSL</i>	<i>CBF1-Supressor of Hairless-LAG1</i>
<i>CXCL12/ SDF-1</i>	<i>C-X-C motif chemokine ligand 12/Stromal cell-derived factor 1</i>
<i>CXCR4</i>	<i>C-X-C motif chemokine receptor 4</i>
<i>DAPK</i>	<i>death associated protein kinase 1</i>
<i>df</i>	<i>degree of freedom</i>
<i>DIS3</i>	<i>DIS3 homolog, exosome endoribonuclease and 3'-5' exoribonuclease</i>
<i>DKK1</i>	<i>dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1</i>
<i>DLEU2</i>	<i>deleted in lymphocytic leukemia 2</i>
<i>DLL</i>	<i>delta like canonical Notch ligand</i>
<i>EZH2</i>	<i>enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2</i>
<i>FAM46C</i>	<i>family with sequence similarity 46 member C</i>
<i>FEZF1-AS1</i>	<i>FEZ family zinc finger 1-antisense RNA 1</i>

<i>FGFR3</i>	<i>fibroblast growth factor receptor 3</i>
<i>GAS5</i>	<i>growth arrest specific 5</i>
<i>GPX3</i>	<i>glutathione peroxidase 3</i>
<i>HOTAIR</i>	<i>HOX transcript antisense RNA</i>
<i>HOXA11</i>	<i>homeobox A11</i>
<i>HULC</i>	<i>hepatocellular carcinoma up-regulated long non-coding RNA</i>
<i>Ig</i>	<i>immünglobulin</i>
<i>IGF-1</i>	<i>insulin like growth factor 1</i>
<i>IGF1R</i>	<i>insulin like growth factor 1 receptor</i>
<i>IGH</i>	<i>immunoglobulin heavy locus</i>
<i>IL-6</i>	<i>interleukin 6</i>
<i>JAG1/JAGGED2</i>	<i>jagged canonical Notch ligand 1</i>
<i>JAG2/JAGGED2</i>	<i>jagged canonical Notch ligand 2</i>
<i>KAT2A</i>	<i>lysine acetyltransferase 2A</i>
<i>KRAS</i>	<i>KRAS proto-oncogene, GTPase</i>
<i>LEF1-AS1</i>	<i>lymphoid enhancer binding factor 1-antisense RNA 1</i>
<i>LSD1</i>	<i>lysine demethylase 1A</i>
<i>LUNAR1</i>	<i>leukemia-associated non-coding IGF1R activator RNA 1</i>
<i>MAF</i>	<i>MAF bZIP transcription factor</i>
<i>MAFB</i>	<i>MAF bZIP transcription factor B</i>
<i>MALAT1</i>	<i>metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1</i>
<i>MAPK</i>	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
<i>MEG3</i>	<i>maternally expressed 3</i>
<i>MRG</i>	<i>Manyetik rezonans görüntüleme</i>
<i>MYB-AS1</i>	<i>MYB proto-oncogene-antisense RNA 1</i>
<i>MYC</i>	<i>MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor</i>
<i>NEAT1</i>	<i>nuclear paraspeckle assembly transcript 1</i>
<i>NOTCH1</i>	<i>Notch receptor 1</i>
<i>NOTCH2</i>	<i>Notch receptor 2</i>

<i>NRAS</i>	<i>NRAS proto-oncogene, GTPase</i>
<i>NSD2</i>	<i>nuclear receptor binding SET domain protein 2</i>
<i>OIP5-AS1</i>	<i>Opa interacting protein 5-antisense RNA 1</i>
<i>PANDA</i>	<i>promoter of CDKN1A antisense DNA damage activated RNA</i>
<i>PAPAS</i>	<i>proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 1</i>
<i>PCA3</i>	<i>prostate cancer associated 3</i>
<i>PD-1</i>	<i>programmed cell death 1</i>
<i>PD-L1</i>	<i>programmed cell death 1 ligand</i>
<i>PEN-2</i>	<i>presenilin enhancer, gamma-secretase subunit</i>
<i>PET-BT</i>	<i>Pozitron emisyon tomografisi-bilgisayarlı tomografi</i>
<i>PI3K-AKT</i>	<i>phosphoinositide-3-kinase-AKT serine/threonine kinase</i>
<i>PRAL</i>	<i>p53 regulation associated lncRNA</i>
<i>PRINS</i>	<i>psoriasis associated non-protein coding RNA induced by stress</i>
<i>PTEN</i>	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
<i>PTENP1</i>	<i>phosphatase and tensin homolog pseudogene 1</i>
<i>RANKL</i>	<i>receptor activator of nuclear factor-κB ligand</i>
<i>RARβ</i>	<i>retinoic acid receptor beta</i>
<i>RBP1</i>	<i>retinol binding protein 1</i>
<i>RUNX2</i>	<i>runt related transcription factor 2</i>
<i>SD</i>	<i>Standard deviation (standart sapma)</i>
<i>SHP1 (PTPN6)</i>	<i>protein tyrosine phosphatase non-receptor type 6</i>
<i>SMAD1-AS1</i>	<i>SMAD family member 1-antisense RNA 1</i>
<i>SOCS-1</i>	<i>suppressor of cytokine signaling 1</i>
<i>SOX2</i>	<i>SRY (sex determining region Y)-box 2</i>
<i>SPARC</i>	<i>secreted protein acidic and cysteine rich</i>
<i>T-ALL</i>	<i>T hücreli akut lenfositik lösemi</i>
<i>TERC</i>	<i>telomerase RNA component</i>
<i>TERT</i>	<i>telomerase reverse transcriptase</i>

<i>TGFB1</i>	<i>transforming growth factor beta induced</i>
TGFβ	transforming growth factor beta
<i>TP53</i>	<i>tumor protein p53</i>
<i>TSIX</i>	<i>TSIX transcript, XIST antisense RNA</i>
t-stat	t-statistics
<i>TUG1</i>	<i>taurine up-regulated 1</i>
<i>UCA1</i>	<i>urothelial cancer associated 1</i>
VEGF	vascular endothelial growth factor
WDR5	WD repeat domain 5
<i>Wnt</i>	<i>Wingless-Type MMTV Integration Site Family</i>
<i>XIST</i>	<i>X inactive specific transcript</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. 1990-2017 yılları arasında MM insidansının ülkelere göre değişimi (Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME)'nin sitesinden alınmıştır (14)).	3
Şekil 2.2. Plazma hücre neoplazilerinin gelişimi (Kumar ve arkadaşları, 2017'den uyarlanmıştır (4)).	11
Şekil 2.3. Multiple myeloma hücresinin kemik iliği mikroçevresi ile etkileşimi (Kumar ve arkadaşları, 2017'den uyarlanmıştır (4)).	13
Şekil 2.4. Notch yolağı (Bray, 2006'dan uyarlanmıştır (77)).	17
Şekil 2.5. Yerleşimlerine göre lncRNA'lar (Jarroux ve arkadaşları, 2017'den uyarlanmıştır (108)).	21
Şekil 2.6. Hedefleri üzerindeki etki mekanizmalarına göre lncRNA'lar (Wang ve Chag, 2011'den uyarlanmıştır (117)).	24
Şekil 2.7. LUNAR1'in IGF1R lokusundaki etki mekanizması (Trimarchi ve arkadaşları, 2014'ten uyarlanmıştır (8)).	31
Şekil 3.1. Yoğunluk gradyan santrifüjleme ile kemik iliği mononükleer hücrelerin ayrılması.	33
Şekil 3.2. LUNAR1'in farklı transkriptleri ile kullanılan primer çiftinin ilişkisi. a: Ensembl'da tanımlı transkriptler (166); b: NCBI-Gene'de tanımlı transcript (167).	36
Şekil 4.1. ACTB ekspresyon analizi için oluşturulan standartların amplifikasyon eğrisi ve standart eğri grafiği.	44
Şekil 4.2. Olgu 1'den olgu 10'a kadar hastaların ACTB amplifikasyon eğrisi.	44
Şekil 4.3. Olgu 11'den olgu 27'ye kadar hastaların ACTB amplifikasyon eğrisi.	45
Şekil 4.4. Olgu 29'dan olgu 38'e kadar hastaların ACTB amplifikasyon eğrisi.	45
Şekil 4.5. Kontrol grubunun ACTB amplifikasyon eğrisi.	46
Şekil 4.6. LUNAR1 ekspresyon analizi için oluşturulan standartların amplifikasyon eğrisi.	47
Şekil 4.7. LUNAR1 ekspresyon analizi için oluşturulan standart eğri.	47

Şekil 4.8. Olgu 1'den olgu 18'e kadar hastaların LUNAR1 amplifikasyon eğrisi.	48
Şekil 4.9. Olgu 19'dan olgu 26'ya kadar hastaların LUNAR1 amplifikasyon eğrisi.	48
Şekil 4.10. Olgu 27'den olgu 38'e kadar hastaların LUNAR1 amplifikasyon eğrisi.	49
Şekil 4.11. Kontrol grubunun LUNAR1 amplifikasyon eğrisi.	50
Şekil 4.12. Tüm olgular ve tüm kontrollerin gen ekspresyon oranlarının karşılaştırılması.	51
Şekil 4.13. MM olguları ve tüm kontrollerin gen ekspresyon oranlarının karşılaştırılması.	52
Şekil 4.14. SMM olguları ve tüm kontrollerin gen ekspresyon oranlarının karşılaştırılması.	52
Şekil 4.15. MGUS olguları ve tüm kontrollerin gen ekspresyon oranlarının karşılaştırılması.	52
Şekil 4.16. R-ISS evrelerine göre MM hastalarının ve kontrollerin gen ekspresyon oranları.	53
Şekil 4.17. Evre 2 ve 3 hastaların ortalama gen ekspresyon oranlarının kontrollerle (sol) ve evre 1 hastalarla (sağ) karşılaştırılması.	53

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1. Multiple myeloma için tanısal çalışmalar (5).	5
Tablo 2.2. International Myeloma Working Group (IMWG) 2014 multiple myeloma ve smouldering multiple myeloma tanı kriterleri (19).	6
Tablo 2.3. IMWG MGUS ve ilişkili plazma hücre neoplazileri tanı kriterleri ve progresyon riskleri (19).	8
Tablo 2.4. SMM'de sitogenetik risk belirleyiciler (32).	10
Tablo 2.5. Multiple myelomada sitogenetik risk belirleyiciler (30).	10
Tablo 2.6. Multiple myelomda hipermetile olan tümör baskılayıcı genlere örnekler	12
Tablo 2.7. Notch yolağı elemanları.	16
Tablo 3.1. cDNA sentez reaksiyon karışımının hazırlanması.	35
Tablo 3.2. Real time rtPCR'da kullanılan primer dizileri.	36
Tablo 3.3. Real time rtPCR karışımı	37
Tablo 3.4. Real time rtPCR reaksiyon koşulları	37
Tablo 4.1. Hasta grubunun demografik verileri ve klinik bulguları.	39
Tablo 4.2. Hasta grubunun immünglobulin alt tipleri ve R-ISS evreleri.	41
Tablo 4.3. Hastaların konvansiyonel ve moleküler sitogenetik bulguları.	42
Tablo 4.4. Hastaların ACTB için ortalama Ct değerleri.	45
Tablo 4.5. Kontrollerin ACTB için ortalama Ct değerleri.	46
Tablo 4.6. Hastaların LUNAR1 için ortalama Ct değerleri.	49
Tablo 4.7. Kontrollerin LUNAR1 için ortalama Ct değerleri.	50

1. GİRİŞ

Multiple Myeloma (MM), post-germinal merkez B hücrelerden köken alan plazma hücrelerinin malignitesi olup ikinci en sık görülen hematolojik malignitedir ve tüm hematolojik malignitelerin yaklaşık %10'unu oluşturur (1). Hastalık, serum ve idrarda tespit edilebilen monoklonal immunglobulinlerin sekresyonu ile karakterize olup en sık görülen bulgular anemi, litik ve osteopenik kemik lezyonları, enfeksiyonlar ve böbrek hasarıdır. MGUS (Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance) ve SMM (smouldering multiple myeloma), multiple myelomanın erken basamaklarını oluşturur (2).

MM patogeneğinde genetik etmenler ve tümör mikroçevresi ile etkileşim tümör progresyonu doğrultusunda birlikte hareket eder. Genetik faktörleri temelde birincil (*IGH (immunoglobulin heavy locus)* translokasyonları, hiperdiploidi) ve ikincil (*MYC (MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor)* translokasyonları, kopya sayısı değişiklikleri (CNV), nokta mutasyonları) genetik değişiklikler oluşturur (3). Bunun yanında tümör mikroçevresi içinde hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleri ile sağlanan çift yönlü etkileşim, myeloma gelişimi ve progresyonunda önemli rol oynamaktadır (4, 5). Tümör mikroçevresi ile etkileşimde önemli rolleri belirlenmiş yolaklardan birisi olan Notch yolağı; adezyon, migrasyon, tümör büyümesi, apoptoz direnci ve kemik lezyonlarının oluşması gibi tümör gelişim sürecinin kritik ve çeşitli düzeylerinde rol oynamaktadır.

Son yıllarda genomun protein kodlamayan bölgelerinin işlevine yönelik çalışmalar gitgide önem kazanmaktadır. Bu bölgelerin ürünü olan protein kodlamayan (non-coding) RNA'lardan 200 nükleotidden daha uzun olanları long non-coding RNA (lncRNA) olarak sınıflandırılmaktadır (6). lncRNA'ların hem fizyolojik süreçlerde hem de hastalıklarda etkili olduğu anlaşılmıştır. Bu nedenle tanısal veya prognostik biyo-belirteç ve tedavi hedefi olarak kullanılabilecekleri öngörülmektedir; hatta, belli kanser tiplerinde güncel olarak biyo-belirteç olarak kullanılan lncRNA'lar bulunmaktadır (7). Bu nedenle lncRNA'ların çeşitli hastalıklarla ilişkilerine yönelik araştırmalara oldukça

yüksek gereksinim bulunmaktadır. Yakın zamanlı bir çalışmada bulunan *LUNAR1* (*leukemia-associated non-coding IGF1R activator RNA 1*), Notch yolağı aktivasyonu ile ekspresyonu düzenlenen ve T-ALL ve diffüz büyük B hücreli lenfomada ekspresyon artışı olduğu gösterilen bir lncRNA'dır (8, 9).

Çeşitli genetik ve epigenetik etmenlerin rol oynadığı multiple myeloma patogeneğinde Notch yolağı ve tümör-mikroçevre etkileşimleri açısından Notch ilişkili bir lncRNA olan *LUNAR1*'in patogeneğinde etkili olabileceği düşünülebilir. Konu ile ilgili literatür incelendiğinde daha önce multiple myeloma hastalarında *LUNAR1* ekspresyon düzeylerinin araştırıldığı bir çalışma bulunmadığı görülmüştür.

Bu çalışmanın gerçekleştirilme gerekçeleri

- Multiple myeloma hastalarında *LUNAR1* ekspresyon düzeyinin araştırıldığı ilk çalışma olması,
- lncRNA'lar ile hastalık etyopatogenezinin ilişkisini açıklamaya katkı potansiyeli,
- Ve multiple myeloma patogenezinin anlaşılması bakımından literatüre katkı sağlama hedefi olarak özetlenebilir.

Bu amaçla, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı'na başvuran MM, SMM ve MGUS hastalarına ait kemik iliği örneklerinden CD138+ plazma hücreleri ayrıştırılarak bu hücrelerde *LUNAR1* ekspresyon düzeyleri saptanmıştır. Bu sonuçlar çeşitli sebeplerle kemik iliği aspirasyonu yapılan ve malignite saptanmayan bireylerden ayrıştırılan CD138+ plazma hücrelerindeki *LUNAR1* ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırılmıştır. Ek olarak, hastalar çeşitli klinik verilerine göre gruplandırılmış, gruplar arasında *LUNAR1* ekspresyonu açısından farklılıklar incelenmiştir.

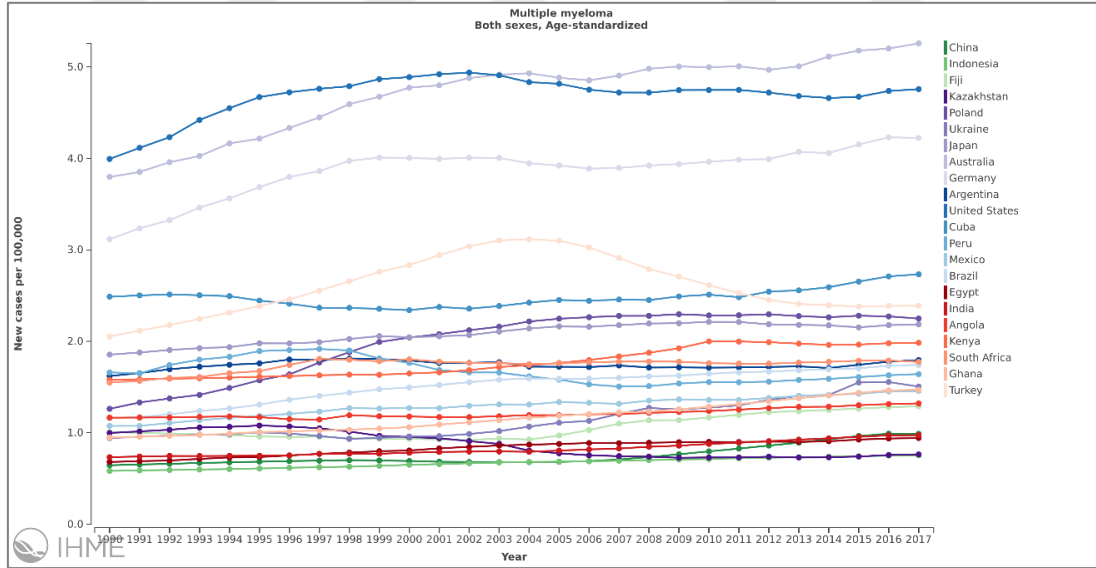
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Multiple Myeloma

Multiple myeloma, malign plazma hücrelerinin kemik iliği mikroçevresindeki proliferasyonu ile serum ve idrarda monoklonal immünglogulin artışı ve uç organ hasarı ile karakterize bir hastalıktır (10).

2.1.1. Epidemiyoloji

MM, ikinci en sık görülen hematolojik malignitedir (1). “Global Burden of Disease” girişimi tarafından, 2016 yılında dünya genelinde yaklaşık 138 bin hasta ve yaklaşık 98 bin MM ilişkili ölüm bildirilmiştir; bununla birlikte yaşa göre standardize edilmiş hastalık insidansı ise 100.000 kişide 2,1 olarak bulunmuştur (11). Ülkemize ait bir sıklık çalışması bulunmasa da Dünya Sağlık Örgütüne bağlı “The Global Cancer Observatory” raporuna göre, 2018 yılında Türkiye’de 2331 yeni olgu ve 1509 multiple myeloma ilişkili ölüm bildirilmiştir (12). Yine aynı raporda 2018 yılında dünya genelinde 159 bin yeni hasta ve 106 bin MM ilişkili ölüm bildirilmiştir (13).



Şekil 2.1. 1990-2017 yılları arasında MM insidansının ülkelere göre değişimi (Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME)’nin sitesinden alınmıştır (14)).

MM sıklığının en yüksek olduğu bölgeler sırasıyla Avustralya, Kuzey Amerika ve Batı Avrupa olarak belirlenmiştir ve 1990 ile 2016 arasında hastalık sıklığının dünya genelinde %126 arttığı görülmüştür (Şekil 2.1) (11).

2.1.2. Klinik Bulgular

Hastalık semptomatik olduğu durumda en sık görülen bulgular anemi, litik ve osteopenik kemik lezyonları, enfeksiyonlar ve böbrek hasarı; hastaların en sık şikâyetleri ise yorgunluk ve kemik ağrılarıdır (15). Ancak tanı olanaklarının gelişmesi ile son yıllarda henüz asemptomatik dönemde tanı alan hasta sayısı artmıştır (5). Hastalığın median tanı yaşı 66'dır (2). Özellikle ileri yaşta görülen bel ağrıları ve sebebi bilinmeyen anemi varlığında MM açısından değerlendirme yapılmalıdır. Daha az olarak hastalarda parestezi ve ateş görülebilir (2).

MM hastalarının %82'sinde serum veya idrarda protein elektroforezi ile monoklonal immünglobin proteinleri saptanmakta olup, en sık saptanan alt tip IgG'dir (2). Ayrıca, hastalarda uç organ hasarına bağlı hiperkalsemi ve serum kreatinin düzeylerinde artış görülür. Böbrek yetmezliği, serbest hafif zincirlerin böbrekte birikmesi sonucu olabileceği gibi, amiloidoz veya hiperviskoziteye bağlı olarak da gelişebilir (4). Tanı anında hastaların yaklaşık %2-3'ünde malign plazma hücrelerinin kemik iliği dışına yerleşmesi ile karakterize ekstramedüller hastalık bulunabilir (16, 17).

Tablo 2.1'de tanısal süreçte yapılması gerekenler özetlenmiştir. Standart tanısal değerlendirme serum ve idrar protein elektroforezi, immünfiksasyon ve hafif zincir araştırmasının yanında tam kan sayımı, elektrolitler (özellikle kalsiyum), serum kreatinin, albümin, laktat dehidrogenaz ve β 2-mikroglobulin ölçümlerini içermelidir. MM hastalarının %97'sinde malign plazma hücrelerinden salgılanan bir monoklonal (M) protein artışı gözlenir ve serum immünfiksasyon ile bu proteinin alt tipi belirlenir (18). En sık görülen alt tip IgG (%54) olup diğerleri sırasıyla IgA, serbest κ , serbest λ , IgD, biklonal ve IgM alt tipleridir. Hastaların %7 kadarında M proteini bulunmayabilir (2). Bir başka değerlendirme ölçütü olan serum serbest zincir oranı (FLC ratio), ağır zincirlerden bağımsız olarak dolaşan immünglobulin κ ve λ hafif zincirlerinin oranını ifade eder. κ/λ oranı normalde 0,26-1,65 aralığındadır (19). Baskın olan hafif zincirin diğerine oranının (involved: uninvolved FLC) 100'ün üzerinde olması MM tanısını destekler.

Tablo 2.1. Multiple myeloma için tanısal çalışmalar (5).

Kan	Serum protein elektroforezi ve immünfiksasyon Kantitatif serum immünglobulinleri Serum serbest hafif zincir düzeyleri Total serum albümin, protein, kalsiyum, LDH, elektrolit β 2-mikroglobulin Hemoglobin, beyaz küre, trombosit düzeyleri
İdrar	İdrar protein elektroforezi ve immün-fiksasyon 24 saatlik idrar proteinleri, hafif zincirler
Kemik iliği	Biyopsi ve aspirattan plazma hücre sayımı, morfolojisi, amiloid* Sitogenetik ve FISH incelemeleri (del13q, del 17p13, t(4;14), t(11;14), t(14;16), 1q+)
Kemikler	X-ray kemik inceleme veya düşük doz kontrastsız BT
Tüm vücut	MRG*, PET-BT* Solid veya kemik dışı plasmatisoma için doku biyopsisi*

*gerekli olduğunda yapılır.

Multiple myeloma şüphesi halinde kemik iliği aspirasyon/biyopsi materyalinde plazma hücresi miktarı ve morfolojisi değerlendirilir. Bazen kemik iliği tutulumunun diffüz değil fokal olması nedeni ile plazma hücresi oranı %10'dan düşük bulunabilir. Diğer kriterlerin karşılanması durumunda MRG (manyetik rezonans görüntüleme) veya PET-BT (Pozitron emisyon tomografisi-bilgisayarlı tomografi) yardımı ile fokal tutulum belirlenip ilgili bölgeden biyopsi alınarak tanı doğrulanabilir (18). Prognozun ve tedavi algoritmasının belirlenebilmesi için kemik iliği materyalinden sitogenetik ve FISH incelemeleri yapılmalıdır. Mutlaka uç organ hasarı değerlendirilmeli; bunun için uygun yöntemle tüm vücut kemik değerlendirmesi yapılmalıdır (5, 20).

Bütün temel klinik incelemeler ışığında International Myeloma Working Group (IMWG) tanı ölçütlerine göre MM tanısı koyulur (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. International Myeloma Working Group (IMWG) 2014 multiple myeloma ve smouldering multiple myeloma tanı kriterleri (19).

Multiple myeloma tanı kriterleri
Klonal plazma hücre oranının $\geq 10\%$ olması veya biyopsi ile kanıtlanmış kemik veya ekstramedüller plazmasitoma ve aşağıdaki ölçütlerden bir veya daha fazlasının bulunması;
Plazma hücre proliferasyonu ile ilişkilendirilebilen uç organ hasarını gösterir bulgular;
- Hiperkalsemi: üst sınırdan 1 mg/dL daha yüksek veya 11 mg/dL'den yüksek serum Ca^{+2} - Böbrek yetmezliği: kreatinin klirensi < 40 mL/dk veya serum kreatinin > 2 mg/dL - Anemi: alt sınırdan 2 g/dL daha düşük veya 10 g/dL'den düşük hemoglobin düzeyi - Kemik lezyonları: Radyografi, BT veya PET-BT ile belirlenmiş bir veya daha fazla osteolitik lezyon bulunması
Malignite belirteçleri:
- Klonal plazma hücre oranının $\geq 60\%$ olması - involved: uninvolved FLC oranının ≥ 100 olması - MRG ile gösterilmiş ≥ 1 fokal lezyon olması
SMM tanı kriterleri
Aşağıdaki kriterlerin her ikisinin de bulunması;
- Serum monoklonal protein (IgG/IgA) düzeyinin ≥ 30 g/dL veya idrar monoklonal protein düzeyinin ≥ 500 mg/24 saat ve/veya klonal kemik iliği plazma hücresi oranının $10-60\%$ arasında olması - MM tanımlayıcı özelliklerinin veya amiloidoz bulunmaması

2.1.3. Hastalık aşamaları ve sınıflandırma

Multiple myeloma, pre-malign bir durum olan MGUS zemininden gelişir. MGUS'tan myelomaya geçişte bir ara basamak olan SMM, uç organ hasarı bulunmayan MM olarak tanımlanır (Tablo 2.3) (5).

MGUS asemptomatiktir; tanı, genellikle rutin laboratuvar incelemeleri sırasında rastlantısal fark edilen bulgular sonucu konulur. IgG ve IgA MGUS, MM tanımlayıcı belirti ve bulguları olmaksızın kemik iliği plazma hücre oranının 10% 'un altında, M-protein miktarının 30 g/L'den az olduğu durumdur (21). Hafif zincir MGUS ise anormal κ/λ oranı (FLC oranı) ve ilgili hafif zincirin konsantrasyon artışının varlığında immüfiksasyon ile monoklonal

immünglobulin ağır zincir pikinin görülmemesi olarak tanımlanır (22). 50 yaş üzeri popülasyonun %3-4'ünde MGUS bulunmaktadır (19). Bir çalışmada multiple myeloma hastalarının %20'sinde daha önceden bilinen MGUS olduğu bildirilmiştir (2). Bir başka çalışmada ise daha önceden MGUS olarak takip edilen MM hastalarında sağ kalımın anlamlı düzeyde arttığı gösterilmiştir (23). MGUS'tan MM'ye veya diğer ilişkili malignitelere ilerleme riski yılda %1 olarak bilinmektedir; hafif zincir MGUS'ta bu oran daha da düşük olarak bildirilmiştir (21). MGUS'tan MM'ye ilerleme riskini öngörmek için birçok parametre belirlenmiştir. Kemik iliği plazma hücresi oranı ve M-protein miktarı klonal yükü göstermesi açısından önemli risk faktörleridir. Kyle ve arkadaşları 1384 hastanın uzun dönem izlemelerini özetledikleri çalışmalarında tanı anındaki M-protein düzeyinin MM'ye ilerlemede en önemli belirteç olduğunu göstermişlerdir (24). Buna göre M-protein düzeyi 25 g/L olan hastanın progresyon riskinin 5 g/L olan hastanın 4,6 katı olduğu görülmüştür. Bunun yanında IgM ve IgA alt tiplerinin progresyon riskleri IgG alt tipine göre daha yüksek bulunmuştur (24, 25). Cesana ve arkadaşlarının çalışmasında ise %6-9 aralığındaki Kİ plazma hücre oranı, %5'in altına göre artmış progresyon riski ile ilişkili bulunmuştur (26). Bunlara ek olarak; anormal FLC oranı, sitogenetik anomaliler, anöploidi, riskli gen ekspresyon profili, artmış kemik rezorpsiyonu, periferik kanda klonal B hücresi bulunması, dolaşan plazma hücrelerinin varlığı, klonal heterojenite gibi özellikler MM'ye ilerleme açısından risk faktörleri olarak tanımlanmıştır (21).

SMM, MGUS ile MM arasında bir ara basamaktır. M-protein düzeyi 30 g/L'nin üzerinde ve/veya kemik iliği plazma hücresi oranı %10'un üzerindeyken uç organ hasarı olmaması ile karakterizedir (19). MM'ye ilerleme riski yıllık %10'dur ve bu risk ilk 5 yıldan sonra giderek azalır (21). SMM'de progresyonun en önemli belirteci, M-protein miktarı ve Kİ plazma hücre oranı ile gözlemlenebilen tümör yüküdür (27). Ek olarak hiperdiploidi, t(4;14), 17p kaybı ve 1q amplifikasyonu tümör yükünden bağımsız risk faktörleri olarak tanımlanmıştır (21).

Plazma hücre neoplazilerinin tanı kriterleri ve progresyon hızları Tablo 2.3'te özetlenmiştir.

Tablo 2.3. IMWG MGUS ve ilişkili plazma hücre neoplazileri tanı kriterleri ve progresyon riskleri (19).

	Tanım	Progresyon riski
MGUS	Serum monoklonal protein düzeyi <30 g/dL Klonal plazma hücresi oranı <%10 Uç organ hasarının yokluğu	%1/ yıl
Hafif zincir MGUS	Anormal FLC oranı (<0,26 veya >0,65) Artmış 'involved' hafif zincir miktarı (FLC<0.26 ise λ; FLC>1.65 ise κ) İmmünglobulin ağır zincir olmaması Uç organ hasarının yokluğu Klonal plazma hücresi oranı <%10 İdrar monoklonal protein düzeyi<500 mg/gün	%0.3/ yıl
Soliter plazmasitom	Biyopsi ile klonal plazma hücresi içeriği gösterilmiş kemik/yumuşak doku lezyonu Normal kemik iliği Omurga ve pelvisin kemik survey ve MR ile normal bulunması Uç organ hasarının yokluğu	%10/ 3 yıl
Minimal kemik iliği tutulumu olan soliter plazmasitom	Biyopsi ile klonal plazma hücresi içeriği gösterilmiş kemik/yumuşak doku lezyonu Kemik iliği klonal plazma hücresi oranı <%10 Omurga ve pelvisin kemik survey ve MR ile normal bulunması Uç organ hasarının yokluğu	%60/ 3 yıl (kemik) %20/ 3 yıl (yumuşak doku)

2.1.4. Genetik Değişiklikler

Multiple myelomada tümöröenez, genetik değişiklikler (*IGH* translokasyonları, hiperdiploidi, kopya sayısı değişiklikleri, DNA hipometilasyonu gibi) ve tümör mikroçevresindeki değişikliklerin birikimi sayesinde gerçekleşir (Şekil 2.2) (4, 10). Primer genetik değişiklikler öncü evrelerin (MGUS ve SMM) oluşumu ve MM gelişimine neden olan translokasyonlar ve anöploidilerdir. *IGH* ve onun partnerleri (*NSD2* (*nuclear*

receptor binding SET domain protein 2, MMSET), FGFR3 (fibroblast growth factor receptor 3), MAF (MAF bZIP transcription factor), MAFB (MAF bZIP transcription factor B), CCND1 (cyclin D1) ve CCND3 (cyclin D3)) arasındaki translokasyonlar ve hiperdiploidi başlıca primer genetik değişikliklerdir. En sık görülen ve CCND1 aşırı ekspresyonuna neden olan t(11;14) MM hastalarının yaklaşık %14'ünde bulunur. t(4;14) %11 oranında görülüp NSD2 ve bazen FGFR3 ekspresyon artışına neden olur ve kötü prognozla ilişkilidir. Daha nadir görülenler ise t(6;14), t(14;16) ve t(14;20)'dir (sırasıyla CCND3, MAF ve MAFB) (3, 4, 10, 28). Hiperdiploidi, hastaların yaklaşık yarısında bulunur ve iyi prognozla ilişkilidir. Trizomi 3 ve 5 varlığının genel sağkalımı arttırdığı; trizomi 21'in ise azalttığı gösterilmiştir (29). Sitogenetik değişiklikler hem SMM'den aktif MM'ye geçişte (Tablo 2.4) hem de aktif MM'nin prognozunda (Tablo 2.5) risk belirleyicidir (30-32).

Primer genetik değişiklikler bir monoklonal plazma hücresinin myelom ve öncüllerini oluşturması için ilk vuruşu yaparken, gelişen klonal plazma hücrelerinde zamanla yeni genetik değişiklikler meydana gelir (Şekil 2.2). Bu sekonder genetik değişikliklerin başlıcaları 1p delesyonu, 1q kazanımı, 13q delesyonu, 17p delesyonu ve MYC onkogenini içeren t(8;14) yanı sıra epigenetik değişiklik olarak da DNA hipometilasyonudur (28). MM hücrelerinde DNA dizileme çalışmaları sonucunda oldukça heterojen bir mutasyon yelpazesinin olduğu görülmüştür. KRAS (*KRAS proto-oncogene, GTPase*) ve NRAS (*NRAS proto-oncogene, GTPase*) her biri %20 oranında görülüp en sık mutasyona uğrayan genlerdir (33). Hastaların %10'unda görülen BRAF (*B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*) mutasyonları da eklendiğinde MAPK (mitogen-activated protein kinase) yolağı mutasyonları MM'de en fazla mutasyon birikimi olan yolaktır; hatta bir kısım hastada bu yolda birden fazla gende eş zamanlı mutasyon bulunmuştur (34, 35). Her ne kadar MAPK yolağı mutasyonları sık görülse de prognoza herhangi bir etkileri görülmemiştir (36). TP53 (*tumor protein p53*), FAM46C (*family with sequence similarity 46 member C*), DIS3 (*DIS3 homolog, exosome endoribonuclease and 3'-5' exoribonuclease*) multiple myelomada sıklıkla mutasyona uğrayan genlerden bazılarıdır (28, 34, 37).

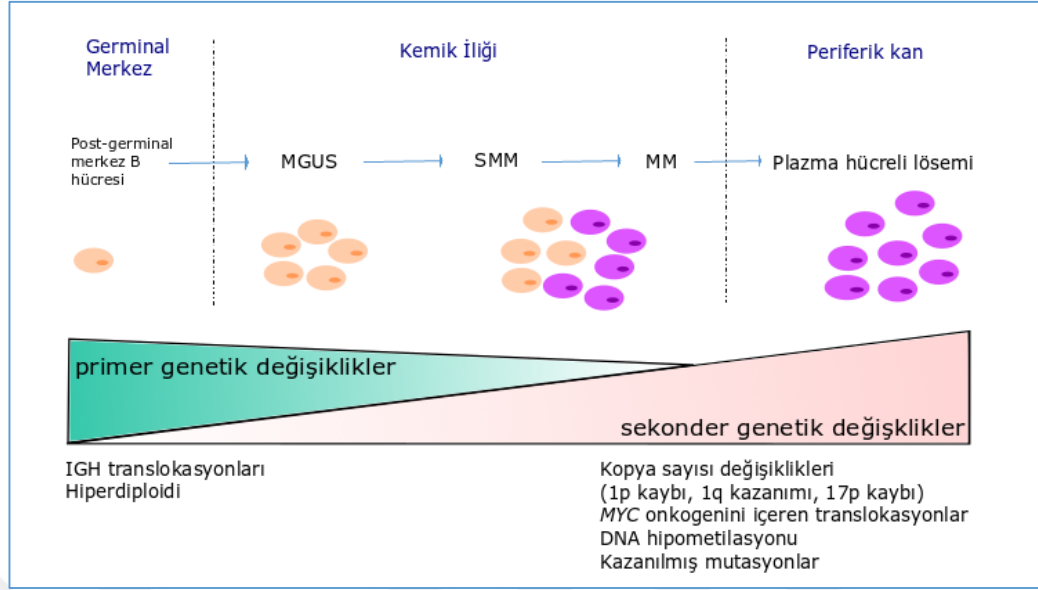
Tablo 2.4. SMM'de sitogenetik risk belirleyiciler (32).

Risk	Sitogenetik değişiklik	Sıklık	MM'ye ilerleme süresi (median-ay)
Yüksek risk	t(4;14) del(17p) 1q21 artışı	%13	24
Orta risk	Trizomiler	%42	34
Standart risk	t(11;14), t(14;16), t(14;20) Trizomi ve IGH translokasyonu birlikteliği* İzole monozomi 13	%30	55
Düşük risk	Normal FISH	%15	-
*t(4;14) trizomilerle birlikte olsa dahi yüksek risk grubundadır			

Tablo 2.5. Multiple myelomada sitogenetik risk belirleyiciler (30).

Yüksek risk	Orta risk	Standart risk
del(17p) t(14;16) t(14;20)	t(4;14) 1q21 kazanımı	Trizomiler t(11;14) t(6;14)

IMWG, MM hastalarının klinik gidişatını öngörebilmek için 2015'te β 2 mikroglobulin, albümin ve LDH düzeyleri ile sitogenetik yüksek risk belirteçlerini (del(17p), t(4;14) ve t(14;16)) birleştiren bir evreleme sistemi geliştirmiştir (38). Buna göre medyan 46 haftalık takip sonucunda evre 1, 2 ve 3'ün 5 yıllık toplam sağ kalım oranı sırasıyla %82, %62 ve %40 olarak bulunmuştur.



Şekil 2.2. Plazma hücre neoplazilerinin gelişimi (Kumar ve arkadaşları, 2017'den uyarlanmıştır (4)).

2.1.5. Epigenetik Değişiklikler

Genetik değişikliklerin yanı sıra MM'de DNA metilasyonu, kromatin yapısı ve kodlamayan RNA'lar gibi epigenetik etkenler de çalışılmıştır. Bunlardan özellikle metilasyon değişiklikleri ile hastalık seyri arasında ilişki bulunmuştur (39). MGUS'tan MM'ye geçişte genom genelinde DNA hipometilasyonu görülürken bazı genlerde hipermetilasyon saptanmıştır (40). Bu hipermetilasyon özellikle hücre döngüsü, DNA tamiri ve apoptoz gibi süreçlerde görevli tümör baskılayıcı genlerde tespit edilmiştir (Tablo 2.6). Genel kanının aksine, MM'de hipermetilasyonun promoter bölgelerden ziyade B hücrelerine özgü transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı enhancer bölgelerinde yoğunlaştığı gösterilmiştir (41). Metilasyon değişikliklerinin yanı sıra histon modifikasyonunda görevli genlerin ifade düzeylerindeki değişiklikler de MM patogenezi ilişkili bulunmuştur. t(4;14) sonucunda, histon H3 lizin 36 di-metilasyonundan sorumlu *MMSET* (*NSD2*)'nin ifade düzeyi; *FGFR3* ile birlikte artmaktadır. Ancak *FGFR3* ekspresyon artışı olmasa dahi hastalarda t(4;14)'ün prognostik etkilerinin devam ettiği gösterilmiş ve bu etkiden *MMSET*'in sorumlu olduğu sonucuna varılmıştır (42). Histon H3 lizin 27 tri-metilasyonu ile ilişkili *EZH2*'nin (*enhancer of zeste 2 polycomb repressive*

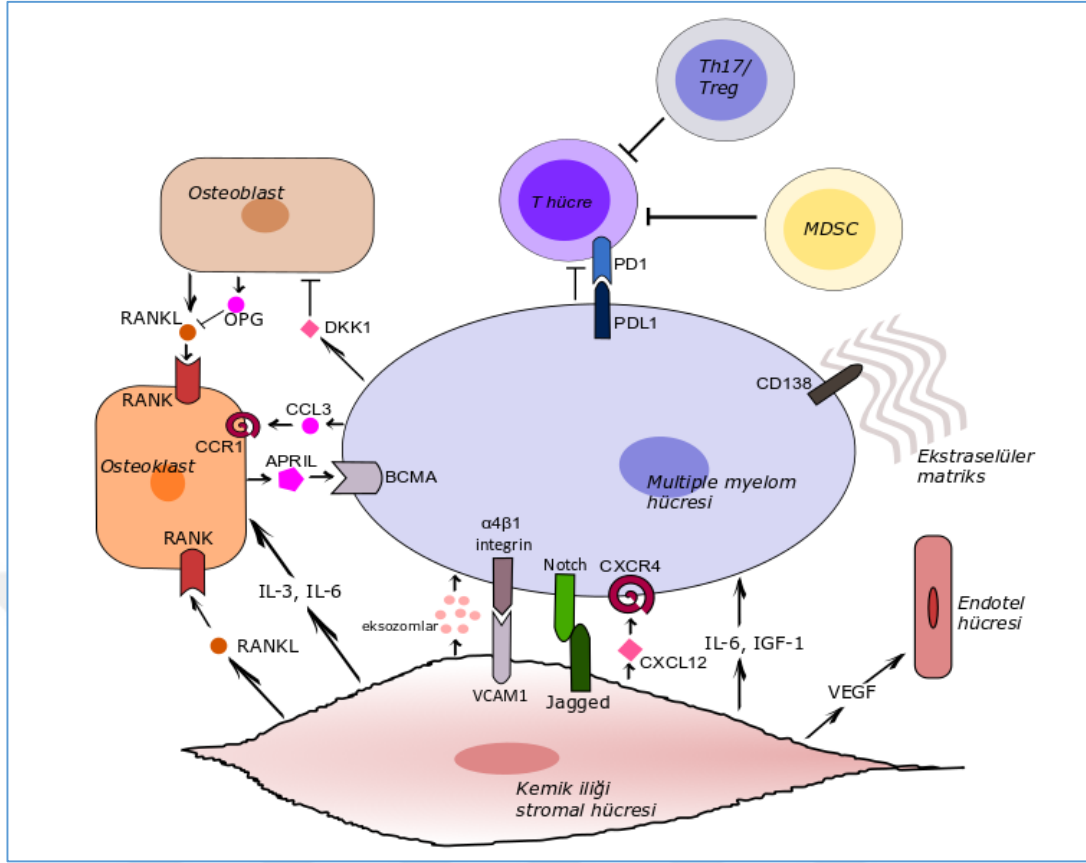
complex 2) MM'de normale göre yüksek oranda ifade bulunduğu gösterilmiş ve kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur (43, 44). Aynı zamanda *EZH2*'nin, bir kısmı da MM ile ilişkili onkogenleri etkileyen, tümör baskılayıcı miRNA'ların ifadesini doğrudan düzenlediği görölmüştür (45). Yapılan çalışmalarda, MM'de miR-21, miR-17-92, miR-32 ve miR221/222 gibi onkogenik miRNA'ların ifadesinin arttığı; miR-15a/16, miR-29b ve miR-34a gibi tümör baskılayıcı miRNA'ların ifadesinin azaldığı gösterilmiştir (46-50). lncRNA'lar ile MM patogenezinin ilişkisi daha sonra tartışılacaktır (2.3.3).

Tablo 2.6. Multiple myelomda hipermetile olan tümör baskılayıcı genlere örnekler

Genler	Referans
<i>CDH1, p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, SHP1, ER, BNIP3, RARb, and DAPK</i>	(51)
<i>p16, SOCS-1, SHP-1</i>	(52)
<i>GPX3, RBP1, SPARC, and TGFB1</i>	(53)
<i>p15, p16</i>	(54, 55)

2.1.6. Tümör mikroçevresi

Multiple myeloma patogenezinde bir diğer etken, son yıllarda önemi daha iyi anlaşılmış olan, kemik iliği mikroçevresidir. Kemik iliği nişi endotel hücreleri, osteoblastlar, osteoklastlar, fibroblastlar, mezenkimal kök hücreler, CXCL12 (C-X-C motif chemokine ligand 12/Stromal cell-derived factor 1, SDF-1)'den zengin retiküler hücreler ve ekstrasellüler matriksten oluşur (4, 56). Kemik iliği mikroçevresini oluşturan bu hücreler salgıladıkları faktörler ve hücre-hücre etkileşimleri ile myeloma hücrelerinin migrasyonu ve proliferasyonunu destekler (şekil 2.3).



Şekil 2.3. Multiple myeloma hücresinin kemik iliği mikroçevresi ile etkileşimi (Kumar ve arkadaşları, 2017'den uyarlanmıştır (4)).

Kemik iliği stromal hücrelerinden (BMSCs) salınan ve multiple myeloma hücre yüzeyindeki CXCR4'e (C-X-C motif chemokine receptor 4) bağlanan CXCL12'nin, myeloma hücrelerinin kemik iliğine migrasyonu ve proliferasyonunda etkili olduğu gösterilmiştir (57). Ek olarak kemik iliği stromal hücreleri üzerindeki VCAM'in, MM hücreleri üzerindeki $\alpha 4 \beta 1$ integrin ile etkileşimi hem hücrelerin kemik iliğine yerleşmesini hem de MM progresyonuna katkı sağlayacak sitokinlerin salınımını sağlar. IL-6 (interleukin 6), VEGF (vascular endothelial growth factor), IGF-1 (insulin like growth factor 1), TGF β (transforming growth factor beta), angiopoetin-1 gibi başka birçok faktörün salınması ile proliferasyon, migrasyon ve anjiogeneze katkı sağlar (4, 56, 58). Örneğin kemik iliği stromal hücreleri kaynaklı IGF-1, PI3K-AKT (phosphoinositide-3-kinase-AKT serine/threonine kinase) ve MAPK yolu üzerinden tümör progresyonunu tetikler (59). BMSCs aynı zamanda MM hücrelerinde Notch yolağını aktive ederek tümörögeneze katkı sağlar (60). Bir

çalışmada, kemik iliği mezenşimal stromal hücrelerinden kaynaklı eksozomların MM hücrelerince alınabildiği ve MM hastalarından toplanan eksozomlarda kontrol grubuna göre daha düşük düzeyde tümör-baskılayıcı miRNA (miR15a ve miR-16-1) bulunduğu gösterilmiştir (61).

Multiple myeloma hücreleri RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand)/osteoprotegerin dengesini RANKL lehine değiştirerek osteoklast aktivitesini artırıp; Wnt (*Wingless-Type MMTV Integration Site Family*), BMP2 (*bone morphogenetic protein 2*) ve RUNX2 (*runt related transcription factor 2*) ekspresyon düzeyini düşürerek osteoblast aktivitesini azaltırlar (56, 58). Myeloma hücrelerinde bir Wnt inhibitörü olan DKK1'in (dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1) artışının osteoblast aktivitesindeki azalmadan sorumlu etmenlerden biri olduğu gösterilmiştir (62). Diğer yandan, BMSCs ile malign plazma hücrelerinin etkileşimi, RANKL salgılanmasını tetikleyerek osteoklast aktivitesini artırır (63). Bu etkiye neden olan faktörlerden biri de myeloma hücresinden salınan CCL3'ün (C-C motif chemokine ligand 3) pre-osteoklastlardaki CCR1 (C-C motif chemokine receptor 1) reseptörüne bağlanarak osteoklast olgunlaşmasını tetiklemesidir (64). Osteoklastlardan salınan APRIL (*TNFSF13, TNF superfamily member 13*) ise malign plazma hücrelerindeki BCMA'ya (*TNFRSF17, TNF receptor superfamily member 17*) bağlanıp hücre proliferasyon ve sağ kalımını artırarak pozitif geri besleme oluşturur (65). Yine BMSCs'den salgılanan IL-3 ve IL-6 gibi sitokinler osteoklastik aktiviteyi destekler (63, 66). Tüm bu etkenler multiple myelom hastalarındaki litik kemik lezyonlarından sorumludur.

Kemik iliği mikroçevre elementlerinden bir diğeri de immün hücrelerdir (63). Normalde çeşitli myeloid hücrelere farklılaşan myeloid kökenli baskılayıcı hücreler (myeloid derived supressor cells-MDSCs), MM'de farklılaşmalarının duraksaması nedeni ile kemik iliğinde birikir (67, 68). Kemik iliğinde biriken MDSCs T lenfositleri baskılarken, regülatuar T (T_{reg}) hücrelerin sayısını artırır (67-69). Bunun yanında, BMSCs etkisi ile T_{reg} ve T-helper-17 (T_H17) hücrelerinin miktarındaki artış, diğer T ve B lenfositlerin baskılanması sayesinde MM hücreleri için immün-toleran bir ortam oluşturur (56, 70). Ayrıca

MM hastalarının T lenfositlerinde *PD-1 (programmed cell death 1 ligand 1)* ekspresyonunun ve bununla birlikte multiple myeloma hücrelerinde de *PD-L1 (programmed cell death 1 ligand)* ekspresyonunun artışı immün-toleransa katkı sağlamaktadır (71).

MM patogeneğinde etkili olduğu bilinen diğerk kemik iliğı mikroçevre elemanı ekstrasellüler matrikstir. Normal kemik iliğı, MGUS ve MM karşılaştırıldığında hastalık ilerledikçe ekstrasellüler matriks bileşenlerinin değıştiğı ve bu yeniden düzenlenmenin tümörögenezi desteklediğı gösterilmiştir (72). MM hücreleri CD-138 (syndecan-1) gibi hücre yüzey elemanları ile ekstrasellüler matrikse bağlanmaktadır (73).

2.2. Notch Yolağı

Notch yolağı, neredeyse tüm çok hücreli organizmalarda korunmuş olan; gelişimsel ve homeostatik birçok süreçte önemli rol oynayan temel bir sinyal yolağıdır (74). Hücre-hücre etkileşimi ile aktive olan doğrusal bir yolaktır ve sonuçta sinyal amplifikasyonu olmaksızın hedef genlerde ifade düzeyi değışikliğine neden olur (75).

Notch yolağı elemanları Tablo 2.7’de özetlenmiştir. Notch ligandları hücre dışındaki bölgelerinde farklı sayılarda epidermal büyüme faktörü (EGF) tekrarları taşıyan transmembran proteinlerdir. N-terminal DSL (Delta-serrata-LAG1) bölgesi sayesinde Notch reseptörü ile etkileşim kurarlar (76). Tırtıklı (sarrate) tip ligandlar, delta benzeri ligandlardan (DLL-delta like canonical Notch ligand) farklı olarak sisteinden zengin bir bölge taşırlar (77).

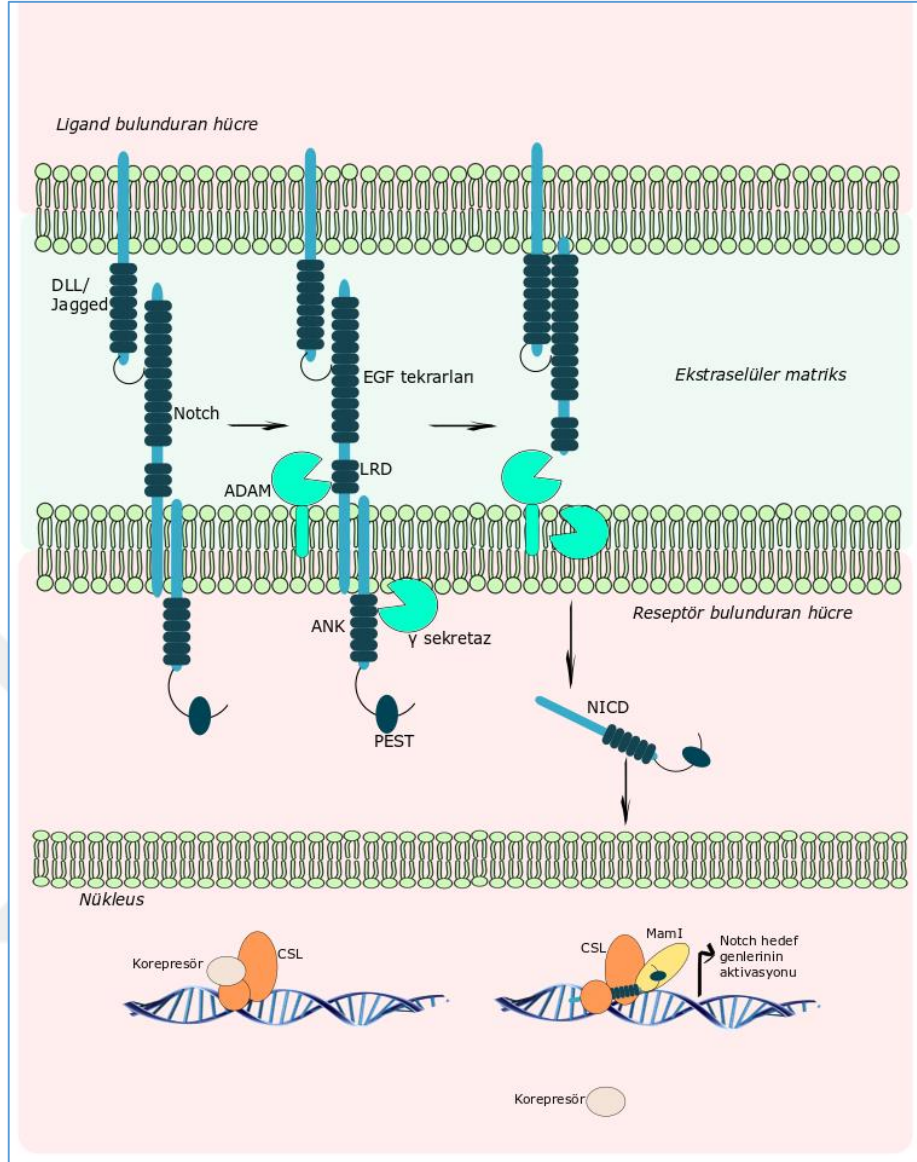
Notch reseptörleri, hücre dışı bölgesinde EGF tekrarlarına ek olarak 3 tane sisteinden zengin LIN tekrarı taşırlar. Hücre dışı bölge transmembran bir bağlantı kısmı aracılığıyla, RAM bölgesi, 6 ankirin tekrarı ve C-terminal PEST bölgesinden oluşan hücre içi parça ile bağlanır (77).

Notch yolağının hücre çekirdeğinde bağlandığı tek transkripsiyon faktörü CSL (CBF1-Supressor of Hairless-LAG1)’dir. CSL transkripsiyon aktivasyonu için ko-aktivatörü Mastermind’a (Maml) ihtiyaç duyar (78).

Tablo 2.7. Notch yolağı elemanları.

Ligand		Reseptör	Enzim	Transkripsiyon faktörü
Delta benzeri	Serrate benzeri	Notch1 Notch2 Notch3 Notch4	ADAM	CSL
DLL1 DLL3 DLL4	Jagged1 Jagged2		γ sekretaz kompleksi	
			Presenilin Nicastrin APH-1 PEN-2	

Notch, endoplazmik retikulumda tek bir aminoasit zinciri şeklinde sentezlenir ve burada fukosilasyona uğrayıp golgiye aktarılır. Golgide bir furin proteazla kesilerek hücre dışı bölümü ile hücre içi bölümü birbirinden ayrılır ve non-kovalent bağlarla bağlanan inaktif bir heterodimer şeklinde hücre membranına gönderilir (79). Jagged (jagged canonical Notch ligand) veya DLL, Notch reseptörü üzerindeki 11 ve 12. EGF tekrarlarına bağlanarak reseptörü aktive eder (Şekil 2.4) Ligandın bağlanması mekanik etki ile Notch'u ADAM'ın bağlanmasına elverişli hale getirir ve ekstraselüler bölüm proteoliz ile uzaklaştırılır (80). γ sekretaz kompleksi ikinci bir proteoliz ile intraselüler bölümü (NICD) serbestleştirir. Serbestleşen NICD nükleusa geçerek burada CSL-Maml ve NICD kompleksinin oluşmasını sağlar ve Notch yolağı ilişkili genlerin transkripsiyonu aktive olur (78).



Şekil 2.4. Notch yolağı (Bray, 2006'dan uyarlanmıştır (77)).

2.2.1. Notch yolağı ve multiple myeloma

Notch yolağı ve onun elementleri tümör büyümesinden, apoptoz direncine; kemik lezyonlarının gelişiminden tedavi direncine kadar MM patogenezinin birçok noktasında, özellikle tümör-mikroçevre etkileşimi bağlamında, rol oynamaktadır (79). Notch aktivasyonu, MM hücrelerinin otonom uyarımı sonucu homotipik veya kemik iliği stromal hücreleri tarafından heterotipik aktivasyon ile gerçekleşebilir (81). Tümörögenезin erken aşamalarından itibaren *JAGGED2* (*JAG2*, *jagged canonical Notch ligand 2*) ekspresyonunun artmış olduğu görülürken; *NOTCH1* (Notch receptor 1) ve *JAGGED1* (*jagged*

canonical Notch ligand 1) ekspresyonunun MGUS'ta daha az MM'de daha fazla olduğu görülmüştür (82, 83). MM hücrelerinde görülen JAG2 overekspresyonu promoter hipometilasyonu ve Jagged2 aktivitesi için gerekli bir ubiquitin ligaz olan sklerotopinin ekspresyon artışı ile ilişkili bulunmuştur (82, 84). MM hücrelerinin kendini yenilemesi (self-renewal) ve kolonizasyonunda Notch ligandı JAG2 ekspresyonunun kritik olduğu gösterilmiştir (85).

MM hücreleri, post germinal merkez B hücrelerinden köken alır. MM hücrelerinin kemik iliğine yerleşmeleri ve dolaşan hücrelerin de sürekli yeni kemik iliği bölgelerini istila etmesi hastalık patogenezinde kritik öneme sahiptir (79). Notch sinyalinin CCR6, CCR5, CCR9, CXCR4 VE CXCR6 gibi kemokin reseptörlerinin ekspresyonunu kontrol ettiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (86-89). Notch aktivasyonunun CXCR4/SDF-1 sistemi üzerinden, her ikisinin ekspresyonunu artırarak, myeloma hücrelerinin kemik nişe yerleşmesinde ve tümör progresyonunda etkili olduğu düşünülmektedir (90). Aynı zamanda MM hücrelerindeki JAG2 ekspresyon artışı hem otonom hem de BMSCs'den IGF-1, VEGF, IL-6 salınımını artırarak proliferasyon, angiogenez ve tedavi direncine neden olur (79, 82). Örneğin yakın zamanda yapılan bir çalışmada, MM hücrelerindeki BMSC kaynaklı Jagged1 aracılı Notch aktivasyonu bortezomib direnci ile ilişkili bulunmuştur (91).

Notch yolağı aktivasyonu MM'deki osteoklast/osteoblast dengesinin bozulmasında da rol oynar: Notch aktivasyonu erken osteoblastlarda Wnt- β katenin yolağını inhibe ederek ve osteositlerde apoptoza neden olarak osteoblast matürasyonunu engeller (92, 93). MM hücrelerinde homotipik veya heterotipik Notch aktivasyonu sonucu salınımı artan SDF-1 osteoklast prekürsörlerini bölgeye çağırırken, RANKL matür osteoklast oluşumunu sağlar (79, 92). Aynı zamanda MM hücre yüzeyindeki DLL1'in osteoklast öncüllerindeki NOTCH2'yi (Notch receptor 2) aktive etmesi ile osteoklastların farklılaşması tetiklenir (94). Son olarak, Notch aktivitesinin çeşitli yollarla regüle edilebilir T (T_{reg}) ve T-helper-17 (T_H17) hücrelerinin anti-tümöral immüniteyi baskılamasında etkili olduğu düşünülmektedir (79).

2.3. Long non-coding RNA'lar

İnsan genomunun büyük kısmının transkripsiyona uğradığı ancak çok küçük bir kısmının protein kodladığı göz önünde bulundurulduğunda, kodlamayan genomun normal gelişim, fizyoloji ve hastalıklarda oynadığı rol merak oluşturmaktadır (95). Bu doğrultuda yapılan birçok çalışma önceleri “kara madde” veya “junk DNA” olarak adlandırılan genomun kodlamayan bölümünün fonksiyonuna yönelik bilimizi giderek artırmaktadır (6). Non-coding (kodlamayan) RNA'lar (ncRNA), genomda transkripsiyonu olan translasyona uğramayan RNA'lardır (96).

ncRNA'lar boyutlarına göre gruplandırılabilir: Mikro RNA (miRNA) ve PIWI-interacting RNA (piRNA) gibi 20-30 nükleotidden oluşanlar kısa, small-nucleolar RNA (snoRNA) gibi 30-200 nükleotidden oluşanlar orta büyüklükte ncRNA'lardır. ncRNA'lar arasında en sık görülen ve en fazla fonksiyonel çeşitlilik gösteren grup, long non-coding RNA'lar (lncRNA), 200 nükleotidden daha uzun protein kodlamayan RNA'lar olarak tanımlanır (6, 97). Bir ncRNA veritabanı olan NONCODE v5.0'da sınıflanan 17 türde toplam 548.640 lncRNA tanımlanmıştır ve insanda tanımlanan lncRNA sayısı 172.216'dır (98). lncRNA'ların birçok hayvan, bitki, mantar, bakteri ve hatta virüste varlığı gösterilmiştir (98-101). Buna rağmen diğer RNA'lar ile karşılaştırıldığında çok daha az korunduğu; hatta büyük çoğunluğunun primatlardan köken aldığı görülmüştür (6, 102). Bu gözlemler lncRNA'ların fonksiyonelliği hakkında şüpheler oluştursa da; lncRNA dizileri içerisinde kısa dizilerin yüksek oranda korunduğu gösterilmiştir (103). Ek olarak, lncRNA'ların embriyonik gelişim, spermatogenez gibi temel süreçlerde potansiyel fonksiyonları olduğu öne sürülmüştür (102). Tüm bu bulgular göz önüne alındığında, lncRNA'ların fonksiyonelliğinin diğer ncRNA'lara göre daha farklı yaklaşımlarla değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varılmaktadır.

lncRNA'lar gen ekspresyonu, kromatin düzenlenmesi, büyüme, farklılaşma ve gelişim gibi birçok hücrel ve fizyolojik süreçlerde yer aldığı gibi, hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir (97, 104). Fizyolojik rolü en iyi bilinen lncRNA X kromozom inaktivasyonunun en önemli düzenleyicisi olan *Xist*'tir (*X inactive specific*

transcript) (105). Birçok lncRNA çeşitli kanserlerde ekspresyon farklılıkları gösterir ve kanser patofizyolojisinde etkilidir; hatta bazı lncRNA'ların kanser biyo-belirteçi ve tedavi hedefi olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Örneğin; lncRNA *HULC* (*hepatocellular carcinoma up-regulated long non-coding RNA*) hepatoselüler karsinoma için potansiyel bir biyo-belirteç adayı iken, prostat kanserlerinin %95'inde ekspresyon artışı gösteren *PCA3* (*prostate cancer associated 3*) güncel olarak prostat kanseri biyo-belirteci olarak kullanılmaktadır (7, 106).

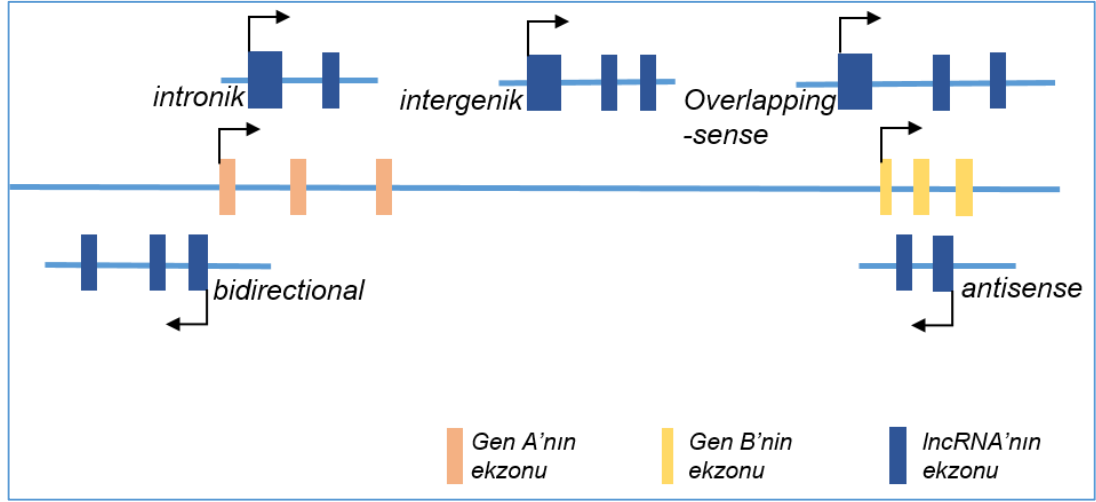
2.3.1. lncRNA sınıflandırması

Resmi bir sınıflandırma sistemi bulunmasa da; lncRNA'lar çeşitli yayınlarda protein kodlayan genlere göre yerleşimlerine, etki mekanizmalarına, DNA'da etki ettikleri yere görece konumlarına (cis/trans), belirli DNA düzenleyici elemanları ve bölgeleri içindeki yerleşimlerine (telomer, sentromer, psödogon vb.), hücre içindeki konumlarına, ilişkili olduğu biyolojik yollara ve fonksiyonlarına göre sınıflandırılmıştır (6, 107).

lncRNA'lar en yaygın olarak protein kodlayan genlerle olan yerleşimsel ilişkilerine göre sınıflandırılırlar (Şekil 2.5):

Uzun intergenik kodlamayan RNAlar (long intergenic ncRNA-lincRNA), kodlayan veya kodlamayan herhangi bir gen ile çakışmayan RNA'lardır (108). lincRNA'lar, RNA polimeraz II ile transkripsiyona uğrayan, 5' başlık eklenmesi, 3' poliadenilasyon ve ayıklanmaya uğrayan RNA'lardır. Aktif transkripsiyonun habercisi olan H3K4-K36 kromatin işaretleri ile işaretlenmiş ve iyi korunmuş genomik bölgelerden ifade olan RNA'lar olarak tanımlanmıştır (104, 109). Ancak bir kısmı iyi korunmuş olsa da, çoğunluğu iyi korunmamasına rağmen özellikle 5' bölgelerinde yoğunlaşan çok iyi korunmuş bölgeler içerirler (110). Çoğu lincRNA çekirdekte yerleşiktir (108).

Intragenik lncRNA'lar protein kodlayan genlerle çakışan lncRNA'lardır. Bunlardan intronik lncRNA'lar, protein kodlayan genlerin intronlarından üretilirler.



Şekil 2.5. Yerleşimlerine göre lncRNA'lar (Jarroux ve arkadaşları, 2017'den uyarlanmıştır (108)).

Intronik lncRNA'lar pre-mRNA'ların ayıklanması sonucu ortaya çıkabilecekleri gibi özgün (totally intronic ncRNA-TIN) transkriptler de olabilirler. Ayıklanma sırasında intronun kıvrılması ile oluşan ve parçalanmadan kaçan 'kement (lariat)' yapılardan kaynaklanan intronik lncRNA'lar sirküler intronik RNA'ları (ciRNA) oluşturur (111). ciRNA'lar kaynaklandıkları protein kodlayan genin transkripsiyon başlangıç bölgesinde birikerek ilgili genin ifadesini artırır.

Overlapping-sense lncRNA'lar, protein kodlayan bir genin tamamını veya bir kısmını kapsayan ve o genle aynı yönde ifade bulan lncRNA'lardır (6). Bunlar da intronik lncRNA'lar gibi dairesel formda bulunabilir.

Antisense lncRNA'lar (asRNA/ancRNA), protein kodlayan veya kodlamayan tanımlı genlerin karşıt zincirinden ifade bulan transkriptlerdir (112). İnsanlarda bulunan lncRNA'ların yaklaşık %33'ü antisense transkriptlerdir (113). Bu grup doğal antisense transkriptleri (NATs) de içine alır. Cis etkili NAT'lar ilişkili kodlayan daldan (sense) yapılan transkriptin ifade düzeyini etkilerken, trans etkili NAT'lar genomun başka yerlerindeki genlere etki eder (108). asRNA'lar ilgili mRNA ile olan dizi karşıtlıklarından dolayı RNA-RNA çifti oluşturarak hem stabiliteyi artırır hem de hedefe özgün etki göstermeyi sağlar (108). SINEUP olarak adlandırılan bazı asRNA'lar içerdikleri "short interspersed nuclear

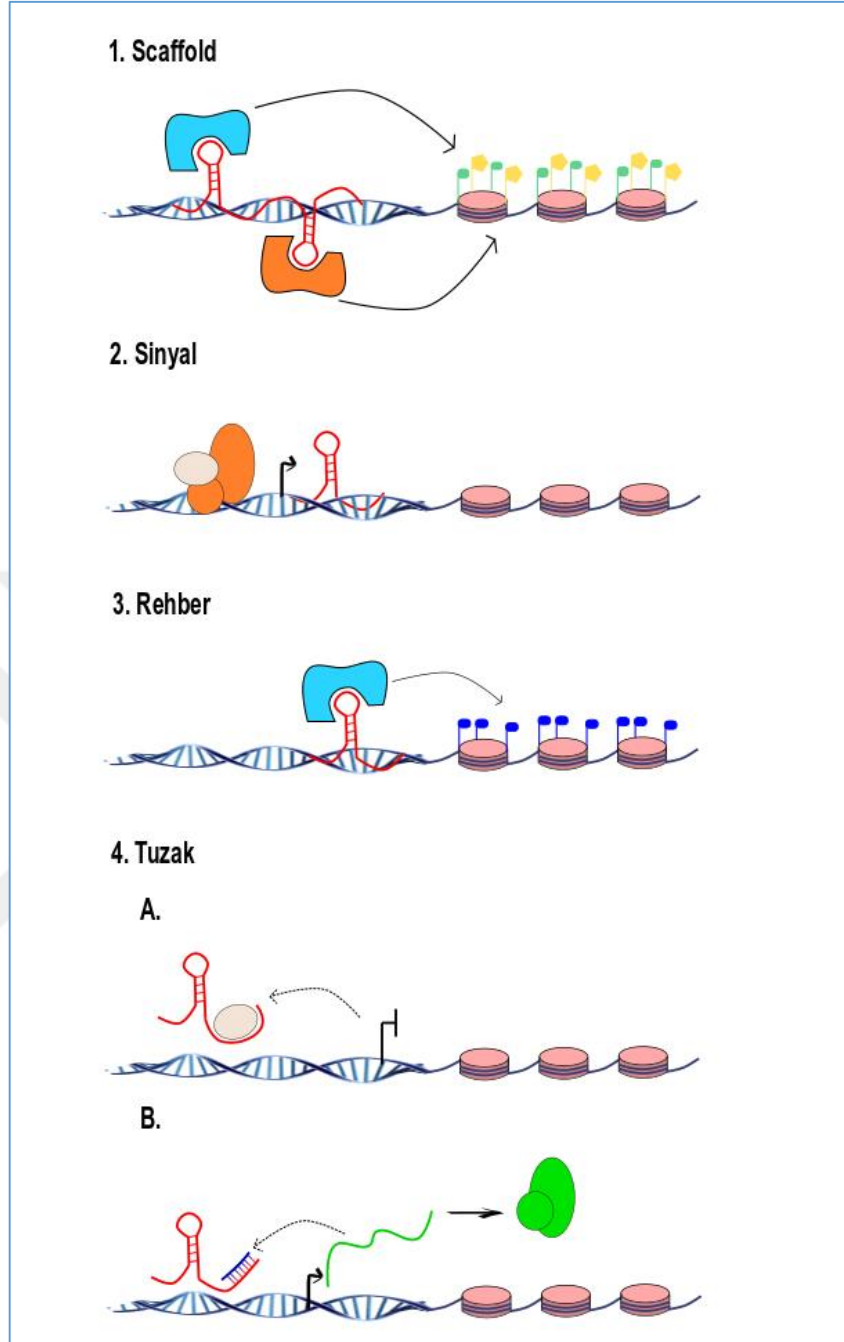
element B2 (SINEB2)” sayesinde mRNA-lncRNA çiftleri oluştururlar ve translasyonu uyarırlar (114).

‘Bidirectional’ (çift yönlü) lncRNA’lar, protein kodlayan genlerin karşıt zincirinde ifade bulan ve bu genlerden iki yönlü çalışan bir promoter içeren kısa bir dizi ile ayrılan transkriptlerdir (115). Yapılan çalışmalarda çift yönlü transkripsiyon yapılan bölgelerde hem sekans içerikleri açısından hem de epigenetik düzenlenmeler açısından farklılıklar görülmüştür. Çift yönlü promoterlerde CCAAT motifi varlığı ve TATA kutusunun yokluğu daha sıklıkla gözlemlenmiştir (115). Ayrıca çift yönlü promoterlerin bulunduğu bölgelerde daha geniş nükleozom bulunmayan bölgeler, transkripsiyon faktör bağlanma motifleri ve aktif transkripsiyon ile ilişkili histon işaretleri (H3K4me1, H3K27ac) bulunduğu gösterilmiştir (116).

lncRNA’lar hedefleri üzerindeki etki mekanizmalarına göre de sıklıkla gruplandırılmıştır (Şekil 2.6). lncRNA’lar, yapısal esneklikleri sayesinde karmaşık üç boyutlu şekillere girebilirler ve farklı bölgeleri ile farklı moleküllere bağlanabilirler. Bu özellik sayesinde **‘scaffold’ lncRNA’lar** ribonükleoprotein (RNP) komplekslerin bir araya getirilmesini sağlar ve bu kompleksler genomda belirli bir hedef üzerinde baskılayıcı veya aktive edici yönde etki gösterebilir (6, 117). Bu lncRNA aracılı RNP oluşumu genomun epigenetik yeniden düzenlenmesine neden olarak başta transkripsiyon olmak üzere DNA ilişkili süreçleri etkiler (118, 119). Örneğin lncRNA *HOTAIR* (*HOX transcript antisense RNA*), 5’ bölgesi ile bir histon metilaz olan PRC2’yi ve 3’ bölgesi ile bir histon demetilaz olan LSD1’i (lysine demethylase 1A) bağlayarak hedef bölgelerde toplar ve eş zamanlı histon modifikasyonunu sağlar (118). Gastrik karsinogenezle ilişkili bulunan lncRNA *GCInc1* de, WDR5 (WD repeat domain 5- histon metiltransferaz kompleksi parçası) ve KAT2A (lysine acetyltransferase 2A- bir histon asetiltransferaz) proteinlerini bağlayarak hedef bölgelerde toplanmasını sağlar ve hedef gen bölgelerinde histon modifikasyonuna neden olur (120). Genomun stabilitesinin sağlanmasındaki temel faktörlerden birisi olan telomeraz, aktivitesi için protein alt ünitesinin (TERT- telomerase reverse transcriptase) yanında bir RNA alt ünitesine (TERC- telomerase RNA component) de ihtiyaç duyar. TERC, hem tekrar

dizisinin sentezi için kalıp oluşturur hem de TERT'in bağlanması için özgün diziler ve kompleksin stabilitesini sağlayan diziler taşır (121).

lncRNA'lar, transkripsiyonları sıkı bir şekilde kontrol edilerek hücre tipine özgün ifade edilir ve çeşitli uyarılara yanıt verir. **Sinyal lncRNA'lar**, belirli biyolojik süreçlerde yer alan ve zaman-mekân bağımlı olarak ifade bulup bu süreçlerin aynı zamanda bir işaretçisi olan transkriptlerdir (117). Örneğin, X kromozom inaktivasyonundan sorumlu *Xist*, dişi yönde gelişim sırasında inaktif X'ten ifade edilir ve *cis* etki ile kromozom boyuca yayılarak gen ekspresyonunu baskılar (122). *Xist*'in örtüşümlü (overlapping) antisense transkripti *Tsix* (*TSIX transcript, XIST antisense RNA*) ise *trans* etki ile aktif X kromozomundan *Xist* ifadesini baskılar (123). lncRNA'lar DNA hasar cevabı gibi süreçlerde de etkili olabilir. DNA hasarına cevaben *CDKN1A* (*cyclin dependent kinase inhibitor 1A*) lokusuna bağlanan p53, buradan *CDKN1A*'nın yanı sıra lncRNA'lar *linc-p21* ve *PANDA*'nın da ekspresyonunu sağlar. *linc-p21*, p53 ilişkili gen baskılanmasında rol oynarken; *PANDA* (promoter of *CDKN1A* antisense DNA damage activated RNA) bir transkripsiyon faktörü olan NF-YA ile etkileşime geçerek apoptozun baskılanmasını sağlar (124, 125).



Şekil 2.6. Hedefleri üzerindeki etki mekanizmalarına göre lncRNA'lar (Wang ve Chag, 2011'den uyarlanmıştır (117)).

Bir başka lncRNA grubu **rehber (guide) lncRNA**'lar olup proteinleri bağlayarak özgün hedeflerine ulaşmalarını sağlarlar (108, 117). Rehber lncRNA'lar 3' uçları ile halen RNA polimeraz II'yle tutturulmuşken 5' uçları ile proteinlerle etkileşim kurarak "eş-transkripsiyon" mekanizması ile *cis* etki gösterirler (126). Hedef DNA'ya RNA:DNA heterodupleksi şeklinde,

RNA:DNA:DNA tripleksi şeklinde veya baz eşleşmesinden tamamen bağımsız olarak karmaşık yüzey etkileşimleri ile bağlanarak *trans* etki de gösterebilirler (117, 127). Örneğin, lncRNA *PAPAS* (*proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 1*), DNA'ya tripleks oluşturarak tutunur ve CHD4'ün (chromodomain helicase DNA binding protein 4) hedef DNA'ya ulaşmasını sağlar (128).

“Tuzak (decoy) lncRNA’lar” transkripsiyon faktörleri, kromatin düzenleyiciler gibi protein hedeflerini bağlayıp uzaklaştırarak hedef bölgelerine ulaşmalarını engellerler (117). Daha önce sinyal fonksiyonundan bahsedilen PANDA, p53 ile aktive olmasının ardından bir nükleer transkripsiyon faktörü olan NF-YA'yı bağlayıp tecrit ederek anti-apoptotik etki gösterir (125). lncRNA *GAS5* (*growth arrest specific 5*), genomik glukortikoid cevap elemanını (glucocorticoid response element) taklit ederek glukokortikoid reseptörlerinin DNA bağlanma bölgelerine bağlanır. Dolayısıyla glukortikoid reseptörleri için bir ‘ribo-represör’ olarak davranır; glukokortikoid reseptörleri ile uyarılan genlerin ifadesinde azalmaya neden olur (129). lncRNA’lar sadece proteinler için değil aynı zamanda miRNA’lar için de tuzak olabilirler (117). miRNA’lar, hedef mRNA’larında bulunan karşıt zincire bağlanarak mRNA’ların translasyonunu engellerler (97). Benzer şekilde protein kodlayan genlerle dizi benzerliği olan lncRNA’lar ile de bağlanabilirler. miRNA'lara bağlanma açısından mRNA'larla yarışan lncRNA'lara **“competing endogenous RNA (ceRNA)”** veya **“sünger (sponge) lncRNA”** adı verilir (108). Özellikle psödogenlerden kaynaklanan transkriptler, miRNA bağlanma bölgelerinden zengin olmaları açısından önemli bir ceRNA kaynağıdır (130). Örneğin *PTENP1* (*phosphatase and tensin homolog pseudogene 1*), *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*) ilişkili miRNA’ları 3’ UTR bölgesi ile bağlayarak PTEN’in hücre içi seviyelerini düzenleyebilir (131).

2.3.2. Normal B hücre gelişimi ve lncRNA’lar

Hematolojik maligniteler penceresinden bakıldığında, hem normal hematopoezde hem de malign dönüşümde lncRNA’ların etkili olduğu görülmekte; tanı, prognoz ve tedavide klinik önemi olabileceği

düşünülmektedir (132). Çeşitli çalışmalarda B hücre alt gruplarına özgü lncRNA ekspresyon profilleri belirlenmiş ve birçok yeni lncRNA tanımlanmıştır (133-137). Ancak bu lncRNA'ların tamamı henüz fonksiyonel olarak anlamlandırılmamıştır.

Casero ve arkadaşları (2015), mRNA'ların ifade deseninin aksine, henüz progenitör düzeyinde iken B ve T hücre serilerinde lncRNA ifade desenlerinin birbirinden farklı olduğunu göstermiştir (133). B ve T hücrelerde transkriptom analizi yapılan bir başka çalışmada belirli lncRNA'ların ifadesinin mRNA ve hücre zarı işaretçilerine göre daha sıklıkla hücre alt grubuna sınırlı olduğu görülmüştür (135).

Daha ileri evrelerdeki B hücreler için ise fonksiyonel olarak farklı grupların birbirine benzer lncRNA ekspresyon profilleri olduğu görülmüştür. Örneğin; Brazao ve arkadaşlarının (2016) yaptığı çalışmada foliküler ve marjinal bölge B lenfositlerin lncRNA ekspresyon profillerinin benzer olduğu gösterilmiştir (134). Buna rağmen olgun germinal merkez B hücrelerinin diğer olgun B hücre gruplarından farklı bir profilde olduğu anlaşılmaktadır (134, 137).

Petri ve arkadaşları (2015) tonsilla ve kemik iliği biyopsilerinden elde ettikleri on bir farklı evreden B hücre alt grubunun protein kodlayan genlerle olan ilişkilerinden yola çıkarak ("guilt by association") lncRNA profillerini incelemiştir (136). Erken evre B hücrelerde (pre B1, pre B2) bazı protein kodlayan genlerin antisense transkriptlerinin (*MYB-AS1* (*MYB proto-oncogene-antisense RNA 1*), *SMAD1-AS1* (*SMAD family member 1-antisense RNA 1*), *LEF1-AS1* (*lymphoid enhancer binding factor 1-antisense RNA 1*)) yanı sıra lincRNA CTC-436K13.6'nın bu hücre grubuna özgün olduğu görülmüştür. Erken B hücrelerde daha yüksek olmak üzere, sentroblast ve sentrositlerde daha önce hücre döngüsü ilerlemesinde etkili olduğu gösterilen *CRNDE* (*colorectal neoplasia differentially expressed*) ifadesi gösterilmiştir. *CRNDE* ifadesi ek olarak plazma hücrelerinde de görülmüştür. Germinal merkez hücrelerine (sentroblast ve sentrosit) özgün transkriptlere bakıldığında ise BCL6'nın hemen öncesinde yerleşik bir lincRNA olan RP11-132N15.3 tanımlanmıştır.

2.3.3. Multiple Myeloma ve lncRNA'lar

lncRNA'ların fizyolojik ve patolojik süreçlerdeki rollerinin ortaya çıkması ile MM patogeneziindeki etkileri de merak konusu olmuştur. Bu nedenle özellikle son yıllarda çeşitli lncRNA'lar ile MM ilişkisi açısından birçok çalışma yapılmıştır (138, 139).

MALAT1 (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1), ilk olarak küçük hücre dışı akciğer kanserinde olmak üzere birçok kanserle ilişkisi tanımlanmış ve alternatif ayıklanma, transkripsiyon düzenlenmesi ve post-trankripsiyonel düzenlenme gibi süreçlerde yer alan onkojenik bir lncRNA'dır (140, 141). Cho ve arkadaşları (2014), çeşitli hastalık evrelerindeki MM hastalarında *MALAT1* ekspresyonunun artmış olduğunu göstermiştir ve *MALAT1*'i bir biomarker olarak önermiştir (142). Bir başka çalışmada ise yüksek *MALAT1* düzeyleri ekstremiteler hastalık gelişimi, daha düşük toplam sağ kalım ve hastaliksız sağ kalım ile ilişkilendirilmiştir (143). *MALAT1* bir otofaji aracısı olan HMGB1'in ekspresyonunu artırarak otofajiyi destekleyip apoptozu kısıtlayarak MM patogeneziine katkıda bulunur (144). Ksenograft fare modelinde *MALAT1* düzeyinin uygun antisense oligonükleotid ile düşürülmesi MM'de önemli bir tedavi hedefi olan proteozom alt ünitesi genlerinin ekspresyonunda azalmaya neden olmuştur (145). Bu çalışma ile *MALAT1*'in MM için güçlü bir tedavi hedefi olabileceği öne sürülmüştür.

lncRNA *MEG3 (maternally expressed 3)*, 'imprinting' nedeni ile yalnızca maternal alelden ifade edilen ve p53 ile ilişkili bir tümör baskılayıcıdır (138). *MEG3* promotor hipermetilasyonunun MM'de hastalık evresi ve alt tipi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (146). Bir başka çalışmada *MEG3*'ün, miR-181a'yı üzerinde toplayarak *HOXA11 (homeobox A11)* ekspresyonunu olumlu yönde etkilediği görülmüştür (147). Aynı çalışmada MM hastalarında *MEG3* ifadesinin azaldığı ortaya koyulmuştur. Ayrıca, MM hastalarının mezenşimal kök hücrelerinde osteogenik farklılaşma sürecinde *MEG3* ekspresyonu düşük bulunmuştur (148). *MEG3*'ün SOX2'yi (SRY (sex determining region Y)-box 2) bağlayıp *BMP4 (bone morphogenetic protein 4)* promoterinden ayırması ve bu

sayede *BMP4* ekspresyonunu artırarak osteogenik farklılaşmayı desteklediği gösterilmiştir.

Sedlarikova ve arkadaşlarının (2017) 83 lncRNA'nın MM'deki ekspresyon düzeylerini incelediği çalışmada; *UCA1* (*urothelial cancer associated 1*) ve *NEAT1* (*nuclear paraspeckle assembly transcript 1*) ekspresyonları MM hastalarında kontrollere göre farklı bulunmuştur (149). Özellikle artmış *UCA1* düzeyi hastaların sağlıklı bireylerden ayırımında yüksek duyarlılık ve özgünlük göstermiştir. Yakın zamanlı bir çalışmada da multiple myelomada *UCA1*'in proliferasyonu artırdığı ve apoptozu kısıtladığı gösterilmiştir (150). *NEAT1* ekspresyonunun incelendiği bir çalışmada hastalarda artmış ekspresyon görülmesine rağmen bu artış prognoz veya moleküler özelliklerle ilişkilendirilememiş (151). Yakın zamanda ise *NEAT1*'in PI3K/AKT yolağını aktive ederek MM proliferasyonunu uyardığı ve artmış *NEAT1* miktarının azalmış sağ kalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (152).

İlk kez kolorektal kanserde tanımlanan *CRNDE*'nin, birçok kanserde yüksek düzeyde ifade edildiği ve kanser hücrelerinde proliferasyonu, göçü, invazyonu ve apoptozu düzenlediği görülmüştür (153, 154). Meng ve arkadaşları (2017), MM hastalarında ve hücre serilerinde *CRNDE* ekspresyonunun arttığını göstermiştir (155). Aynı çalışmada *CRNDE*'nin proliferatif ve anti-apoptotik etkilerinin miR-451 düzeyini azaltmasına bağlı olduğu gösterilmiştir.

MM hastalarında miR-410 ekspresyon düzeyinin araştırıldığı bir çalışmada miR-410 ekspresyon düzeyinin *OIP5-AS1* (Opa interacting protein 5-antisense RNA 1) ile ters orantılı olarak arttığı gözlenmiştir. Bu çalışmada lncRNA *OIP5-AS1* kaybının miR-410 birikimine neden olarak hücre proliferasyonu, hücre döngüsünün ilerlemesi ve apoptoz baskılanması ile sonuçlandığı öne sürülmüştür (156).

lncRNA *CCAT1*'in (*colon cancer associated transcript 1*) ekspresyonu MM hastalarında sağlıklı bireyler ve normal plazma hücrelerine göre yüksek bulunmuştur (157). Bu çalışmada *CCAT1*'in miR-181a-5p'yi bağlayarak *HOXA1* ekspresyonunu artırdığı; böylece MM patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir.

MM hastalarında artmış ekspresyon gösteren bir başka lncRNA da *FEZF1-AS1*'dir (*FEZ family zinc finger 1-antisense RNA 1*) (158). Bu lncRNA, Akt3 inhibitörü olan miR-610'un moleküler süngeridir ve artışı Akt3 üzerindeki baskılanmayı kaldırarak MM hücre proliferasyonuna katkı sağlar.

lncRNA *PRAL* (*p53 regulation associated lncRNA*), MM hastalarında kaybı kötü prognozla ilişkili olan 17p'de yerleşiktir. MM hastalarında *PRAL* ifadesinin kontrollere göre azaldığı; düşük *PRAL* düzeylerinin daha kısa hastalıksız sağ kalım ve toplam sağ kalım ile ilişkili olduğu görülmüştür (159). *PRAL*, BMP2'yi baskılamayı hedefleyen miR-210'u engelleyerek MM'de bortezomib duyarlılığına katkı sağlamaktadır (159).

MM ile ilişkili lncRNA'ları tanımlayabilmek için birçok lncRNA'nın aynı anda değerlendirildiği lncRNA ekspresyon profillemeye çalışmaları yapılmıştır. Ronchetti ve arkadaşları (2016) MGUS, SMM, MM ve plazma hücreli lösemi (PHL) gruplarını içeren 259 hastada 1852 lncRNA'yı değerlendirmiştir (160). *MALAT1*'in de içinde bulunduğu 31 lncRNA'nın ekspresyonunun kontrollere göre farklı olduğu; 21 lncRNA'nın deregülasyon düzeyi ile hastalık ağırlığının ilişkili olduğu görülmüştür. Özellikle *Inc-SEN5-4*, *Inc-CPSF2-2* ve *Inc-LRRC47-1*'in değişen ekspresyonları MGUS'tan plazma hücreli lösemiye ilerleme için anlamlı bulunmuştur. Bu 21 lncRNA içerisinde *GAS5* de bulunmaktadır. Ek olarak moleküler alt tiplerle lncRNA düzeylerinin ilişkisine bakıldığında 13q14'te yer alan *DLEU2*'nin (*deleted in lymphocytic leukemia 2*) ekspresyonunun del13q olan hastalarda azaldığı görülmüştür. Umumi bir veri tabanının verilerinin yeniden anlamlandırılması ile yapılan bir çalışmada ise *RP4-803*, *RP1-43E13.2*, *ZFY-AS1* ve *RP11-553 L6.5* toplam sağ kalım ile ilişkili bulunmuştur (161).

MM'de serum serbest (circulating) lncRNA'larının araştırıldığı az sayıda çalışma vardır. Işın ve arkadaşlarının (2014) KLL ve MM hastalarında serumda serbest lncRNA'ların ekspresyon düzeyini inceledikleri çalışmada *HOTAIR*, *GAS5*, *MALAT1* ve *lincRNA-p21* ekspresyonları düşük; *TUG1* (*taurine up-regulated 1*) ekspresyonu yüksek bulunmuştur (162). lncRNA H19'un MM hücre serilerinde ve hasta hücrelerinde yüksek düzeyde ifade edildiği ve H19

'knockdown'unun NF- κ B baskılanması ile proliferasyonu azalttığı gösterilmiştir (163). Daha sonra serum serbest H19 düzeylerinin MM hastalarında artmış olduğu gösterilmiş; H19 hastalığın tanısı ve klinik evrelemesi için bir biyo-belirteç olarak öne sürülmüştür (164). Dolaşan eksozomlarda lncRNA ekspresyon profillemesi sonucunda lncRNA PRINS'in (*psoriasis associated non-protein coding RNA induced by stress*) MM ve MGUS hastalarını sağlıklı kontrollerden %84,9 duyarlılık ve %83,3 özgünlükle ayırabildiğini göstermiştir (165).

Son yıllarda protein kodlamayan bölgelerdeki transkriptlerin anlamlandırılması ile her gün yeni lncRNA'lar tanımlanmaktadır. Buna karşılık lncRNA'ların MM patogeneze katkılarının anlaşılması için yapılan çalışmalar hala yeterli değildir ve daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

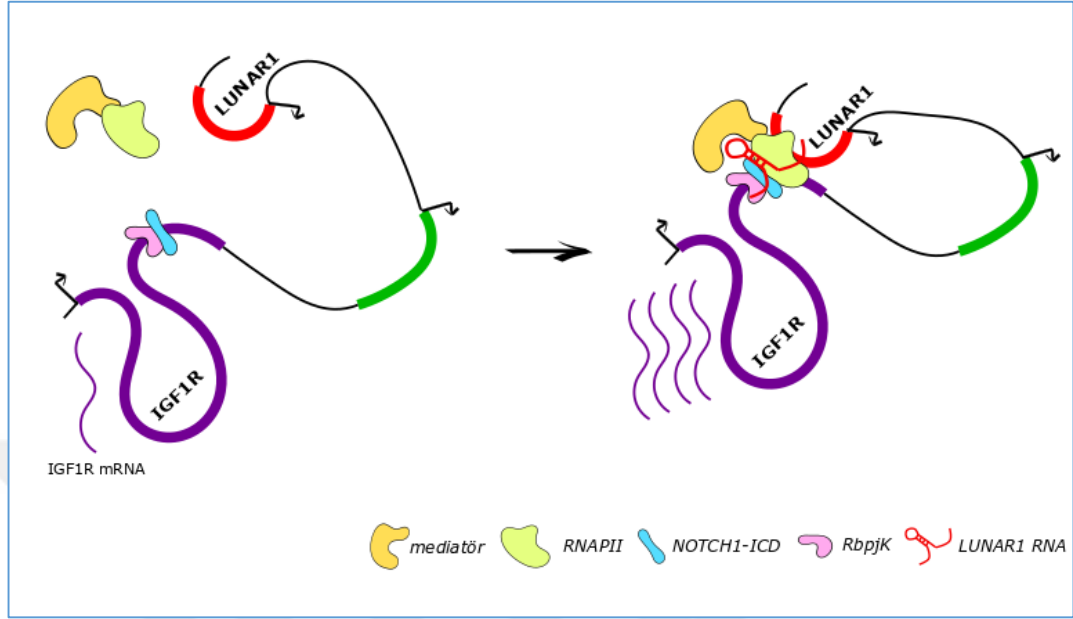
2.4. LUNAR1

LUNAR1, Trimarchi ve arkadaşları tarafından T-ALL'de fonksiyonu tanımlanmış Notch bağımlı bir lncRNA'dır (8). Dört ekzon-431 nükleotidden oluşan *LUNAR1*, 15q26.3'te yerleşiktir. Ensembl'da tanımlı 9, NCBI-Gene'de (National Center for Biotechnology Information-Gene) tanımlı bir transkripti bulunmaktadır (166, 167).

LUNAR1, *IGF1R* (*insulin like growth factor 1 receptor*) lokusunda yer alan *NOTCH1* ile ilişkili bir enhancer tarafından kontrol edilir ve *IGF1R* ekspresyonunu artırır (8). *LUNAR1* ve *IGF1R* geninin son intronundaki enhancer, kromatin katlanması ile yakınlaşır ve böylece *LUNAR1* aktive olur. *LUNAR1* enhancerda mediyatör ve RNA polimeraz II birikimini tetikler. Oluşan bu kompleks *IGF1R* promoterini aktive eder (Şekil 2.7).

Peng ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, diffüz büyük B-hücreli lenfomada hasta dokuları ve hücre serilerinde *LUNAR1* ekspresyonunun normal kontrole göre arttığı gösterilmiştir ve artmış *LUNAR1* ekspresyonu kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (9). Bir başka çalışmada Gene Expression Omnibus (GEO) verileri kullanılarak kolorektal kanser hastalarının lncRNA ekspresyon profilleri ile toplam sağ kalım arasındaki ilişki araştırılmıştır (168). Buna göre *LUNAR1*, *LINC01583*, *LINC00276*, *DKFZp434J0226*, *SFTA1P* ve

OGFOD3 kolorektal kanser prognozu ile ilişkili bulunmuştur. *LUNAR1*, kötü prognoz için hafif etkili bir risk faktörü olarak belirlenmiştir (168).



Şekil 2.7. *LUNAR1*'in *IGF1R* lokusundaki etki mekanizması (Trimarchi ve arkadaşları, 2014'ten uyarlanmıştır (8)).

lncRNA'ların çeşitli kanserlerle ve fizyolojik durumlarla ilişkili temel biyolojik yollardaki etkilerinin önemi giderek daha iyi anlaşılmakta ve genomun daha önceleri gölgede kalan bu kısmına yönelik yapılacak araştırmalara ihtiyaç halen sürmektedir. Oldukça karmaşık ve çok çeşitli genetik ve epigenetik etmenlerin rol oynadığı multiple myeloma patogenezinde Notch yolağı ve tümör-mikroçevre etkileşiminin önemi düşünüldüğünde; Notch ilişkili bir lncRNA olan *LUNAR1*'in patogeneizde etkili olabileceği akla gelmektedir. Bilgimiz dâhilinde, daha önce multiple myeloma ve *LUNAR1* ilişkisi hakkında bir araştırma bulunmamaktadır. Tüm bu bilgilerin ışığında, MM hastalarında *LUNAR1* ekspresyon düzeylerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması ile hastalık patogenezinin anlaşılmasına katkı sağlamayı amaçlamaktayız.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta seçimi ve örneklerin toplanması

3.1.1. Vaka grubu:

Proje başlangıcından itibaren 12 ay içerisinde Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı'na başvuran yeni tanı multiple myeloma, SMM ve MGUS hastaları.

3.1.2. Kontrol Grubu:

Proje başlangıcından itibaren Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı'na çeşitli sebeplerle başvuran ve ayırıcı tanı için kemik iliği aspirasyonu yapıp herhangi bir malignite saptanmayan bireyler.

3.1.3. Dâhil Olma/Olmama Kriterleri

Hasta Grubu:

- 1- International Myeloma Working Group tarafından belirlenmiş tanı kriterleri doğrultusunda multiple myelom, SMM (smouldering multiple myeloma) veya MGUS (Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance) tanısı almış olmak
- 2- Daha önce multiple myelom için tedavi edilmemiş olmak
- 3- 18 yaşından büyük olmak

Kontrol Grubu:

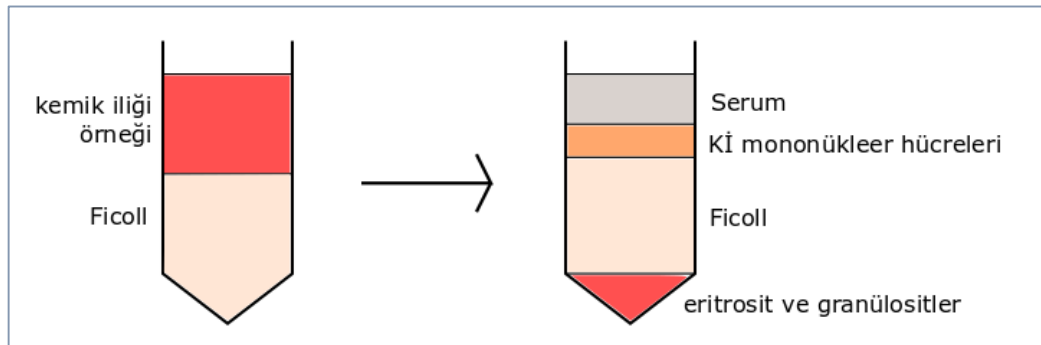
- 1- Çeşitli sebeplerle ayırıcı tanıya yönelik kemik iliği aspirasyon biyopsisi yapıp herhangi bir malignite tespit edilmemiş olmak
- 2- 18 yaşından büyük olmak

3.2. Kemik iliği aspirasyon materyalinden CD138+ plazma hücrelerinin ayrılması

3.2.1. Kemik iliği mononükleer hücrelerin ayrılması

Bu çalışmada kemik iliği mononükleer hücrelerinin ayrılması için, kemik iliğindeki çeşitli hücrelerin yoğunluk farkından faydalanan “yoğunluk gradyan santrifüjleme” ile ayırım yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemle göre kullanılan uygun çözeltinin yoğunluğu, eritrositler ve granülositler gibi daha yoğun hücrelerin santrifüj sırasında aşağıya geçmesini sağlarken, kemik iliği mononükleer hücreleri çözeltinin üstünde kalır (Şekil 3.1). İşlemin basamakları aşağıda özetlenmiştir:

1. Kemik iliği aspirasyon materyali 1:1 oranında %2 Fetal Bovine Serum (FBS) içeren Dulbecco's PBS (phosphate-buffered saline) ile sulandırılır.
2. Santrifüj tüpü içerisine, önerilen ölçüde Ficoll solüsyonu üzerine birbirlerine karışmayacak şekilde kemik iliği-PBS karışımı eklenir.
3. Oda sıcaklığında, 800 G'de 20 dakika santrifüj edilir.
4. En üstteki plazma katmanı ortadaki mononükleer hücre katmanı korunarak alınır.
5. Aradaki mononükleer hücre katmanı ayrılır.
6. Ayrılan mononükleer hücre katmanı 1 kez uygun medium ile yıkanır.



Şekil 3.1. Yoğunluk gradyan santrifüjleme ile kemik iliği mononükleer hücrelerin ayrılması.

3.2.2. CD138+ plazma hücrelerinin ayrılması

Plazma hücreleri, kemik iliği mononükleer hücrelerinden immünmanyetik pozitif seçim yöntemi ile ayrılmıştır. Kullanılan yöntemde, manyetik parçacıklara bağlı uygun antikorlar ile plazma hücre yüzeyindeki CD138 (syndecan-1) bağlanır ve bir magnet kullanılarak tüp yüzeyine sabitlenir. İstenmeyen hücrelerin yıkanması ile CD138+ plazma hücreler saflaştırılmış olur. Bunun için “EasySep™ Human CD138 Positive Selection Kit II (STEMCELL™ Technologies)” kullanılmıştır. İşlemin uygulama basamakları aşağıda özetlenmiştir:

1. 1×10^8 /ml konsantrasyonda olacak şekilde 0,1 ila 2,5 ml mononükleer hücre örneği 5 ml'lik yuvarlak tabanlı tüp içerisine hazırlanır.
2. 50 µl “CD138 pozitif seçim karışımı” eklenir, oda sıcaklığında 15 dakika (dk) bekletilir.
3. Karışımın üzerine manyetik parçacık karışımından 50 µl eklenir, oda sıcaklığında 10 dk bekletilir. (eklenmeden önce manyetik parçacık karışımına birkaç kez pipetaj yapılmalıdır.)
4. Hacmi 2,5 ml'ye tamamlayacak şekilde %2 FBS ve 1 mM EDTA içeren PBS solüsyonundan eklenir yavaşça pipetaj yapılır.
5. Tüp magnet içerisine yerleştirilerek oda sıcaklığında 5 dk bekletilip süre sonunda süpernatant tek bir hareketle dökülür ve tüp duvarında hücreler kalır.
6. Dört ve beşinci basamaklar 3 kez tekrarlanır.
7. Hücreler uygun medium içerisine alınarak ileri işlemler için saklanır.

3.3. Plazma hücrelerinden RNA izolasyonu

Plazma hücrelerinden RNA izolasyonu için Hybrid-R™ (GeneAll) RNA izolasyon kiti kullanılmıştır.

3.3.1. RNA İzolasyon Prosedürü:

1. Hücre pelleti üzerine 250 µl PBS eklenir.
2. Üzerine 750 µl RiboEx™ çözeltisi eklenir, vortekslenir ve oda sıcaklığında 2 dk bekletilir.

3. 200 µl kloroform eklenir, 15 sn karıştırılır ve oda sıcaklığında 2 dk bekletilir. Daha sonra 12000 G'de 15 dk santrifüj edilir.
4. Üstte kalan renksiz faz EzPure™ filtresine aktarılır ve 10000 G'de 30 saniye (sn) santrifüj edilir.
5. Biriktirme tüpüne geçen sıvının üzerine iki katı kadar (yaklaşık 900 µl) RBI tamponu eklenir, pipetle karıştırılır.
6. 700 µl karışım mini-spin filtresine aktarılır, 10000 G'de 30 saniye (sn) santrifüj edilir. Biriktirme tüpüne geçen kısım atılır, filtre tekrar yerine takılır. Örneğin kalan kısmı bitene kadar 5 ve 6. basamaklar tekrarlanır.
7. Filtre üzerine 500 µl RBW tamponu eklenir, 10000 G'de 30 sn santrifüj edilir. Biriktirme tüpüne geçen kısım atılır, filtre tekrar yerine takılır.
8. Filtre üzerine 500 µl RNW tamponu eklenir, 10000 G'de 30 sn santrifüj edilir. Biriktirme tüpüne geçen kısım atılır, filtre tekrar yerine takılır.
9. Kalan RNW'nin temizlenmesi için herhangi bir şey eklenmeden 10000 G'de 1 dk santrifüj edilir. Biriktirme tüpüne geçen kısım atılır.
10. Filtre 1,5 ml'lik steril tüpe takılır, üzerine 50 µl steril distile su eklenir. 10000 G'de 1 dk santrifüj edilir. Tüpte biriken RNA daha sonra kullanılmak üzere -80°C'de saklanır.

3.4. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için "WizScript™ cDNA Synthesis Kit (High Capacity)" kullanılmıştır. İşlem basamakları aşağıda özetlenmiştir:

Tablo 3.1. cDNA sentez reaksiyon karışımının hazırlanması.

Malzeme	Miktar (µl)
10x reaksiyon karışımı	2
20x dNTP karışımı	1
Random hexamer	2
WizScript™ Rtase	1
RNaz inhibitörü	0,5
Steril distile su	3,5
RNA	10
Toplam	20

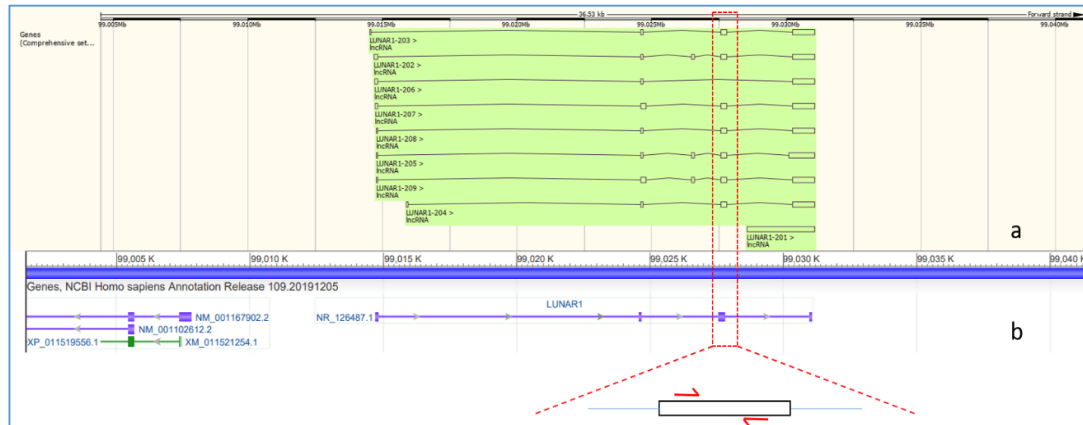
1. Bileşenler Tablo 3.1'de verilen ölçülerde bir tüpün içerisinde karıştırılır.
2. Nazıkçe karıştırılarak 25°C'de 10 dk inkübe edilir.
3. 37°C'de 120 dk inkübe edilir.
4. Reaksiyon 85°C'de 5 dk inkübasyon ile sonlandırılır.

3.5. Real-time reverse transkriptaz PCR

Real-time reverse transkriptaz PCR reaksiyonu için, hedef bölge *LUNAR1* ve endojen kontrol *ACTB*'ye (aktin beta) özgün primerler (Tablo 3.2) ile WizPure™ qPCR Master (SYBR) karışımı kullanılmıştır. Primer çiftinin *LUNAR1* transkriptleri ile ilişkisi Şekil 3.2 gösterilmiştir. Karışım içeriği Tablo 3.3'te gösterilmiştir. Karışım hazırlandıktan sonra üzeri kapatılarak Roche Light Cycler® 480 cihazında tabloda belirtilen koşullarda reaksiyon gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.4).

Tablo 3.2. Real time rtPCR'da kullanılan primer dizileri

<i>LUNAR1</i>	Forward primer	GAACTCTTGCCTTGCTCACA
	Reverse primer	TTCAAGCTTGGGTCTGTCTGG
<i>ACTB</i>	Forward primer	ACTCTTCCAGCCTTCCTTC
	Reverse primer	ATCTCCTTCTGCATCCTGTC



Şekil 3.2. *LUNAR1*'in farklı transkriptleri ile kullanılan primer çiftinin ilişkisi. **a:** Ensembl'da tanımlı transkriptler (166); **b:** NCBI-Gene'de tanımlı transcript (167).

Tablo 3.3. Real time rtPCR karışımı

Malzeme	Miktar (µl)
qPCR master karışımı	10
Forward primer	0,5
Reverse primer	0,5
dH ₂ O	7
Kalıp cDNA	2
Toplam	20

Tablo 3.4. Real time rtPCR reaksiyon koşulları

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
İlk inkübasyon	95	5 dk	1
Amplifikasyon	95	10 sn	40
	68	10 sn	
	72	10 sn	
Melting Curve	95 → 68	1 sn/adım	1
Soğuma	40		1

3.6. Sonuçların değerlendirilmesi ve istatistiksel analiz

3.6.1. Real time reverse transcriptase PCR analizi

Her bir olgu ve kontrolde negatif (no-template control) ve pozitif kontrole karşı hem hedef gen (*LUNAR1*) hem endojen kontrol (*ACTB*) için 2'şer ayrı reaksiyon yapılmıştır.

LightCycler® 480 Software ile her bir vakanın ve kontrolün *LUNAR1* ve *ACTB* Ct değerleri kendilerine ait iki reaksiyondan çıkan Ct değerlerinin ortalaması alınarak belirlenmiştir.

Elde edilen veriler kullanılarak Pfaffl (2001) yöntemi ile *LUNAR1* ekspresyonunun *ACTB*'ye göre rölatif kantitasyonu yapılmıştır (169). Bu yöntemle rölatif ekspresyon oranı, reaksiyon etkinlikleri ve Ct değerleri kullanılarak hesaplanmaktadır. $\Delta\Delta C_t$ metodunun aksine reaksiyon etkinliklerini de hesaba kattığı için hedef bölge ile endojen kontrol arasında reaksiyon etkinlikleri açısından fark olduğunda kullanılması önerilmektedir. Rölatif

ekspresyon oranının Pfaffl yöntemi ile hesaplanma formülü aşağıda gösterilmiştir:

$$\text{Rölatif ekspresyon oranı} = \frac{(E_{\text{Hedef}})^{\Delta C_{t_{\text{Hedef}}}}}{(E_{\text{Referans}})^{\Delta C_{t_{\text{Referans}}}}}$$

3.6.2. İstatistiksel Analiz

Bu araştırma bir ön çalışma niteliğinde olup MM hastaları ve normal popülasyonda *LUNAR1* ifade düzeyleri ilk kez belirlenecektir. İfade düzeylerinin normal dağılıma uyduğu varsayılarak hasta ve kontrol grubu arasında fark olmadığı boş hipotez olarak önerilecektir. Örnek sayılarının en az 20 ve üzerinde olması hedeflenmektedir. Hipotezin testi için iki yönlü anlamlılık karşılaştırması amacıyla t-testi kullanılacaktır. İstatistiksel analizler için Microsoft® Office Excel kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Hasta grubu

Çalışma kapsamında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalına Mayıs 2019-Aralık 2019 tarihleri arasında başvurup multiple myeloma ön tanısı ile kemik iliği aspirasyonu yapılan 38 hastadan örnek toplanmıştır.

Bu hastalardan 8 tanesi klinik, genetik ve patolojik değerlendirme sonucunda multiple myeloma ile uyumlu bulunmadığı için çalışmadan dışlanmıştır. Çalışmaya dâhil edilen 30 hastanın 11'i erkek 19'u kadındır. Hastaların yaş ortalaması 63,9'dur. Erkek ve kadın hastaların yaş ortalamaları sırasıyla 63,16 ve 63,86 olarak hesaplanmıştır.

IMWG tanı ölçütlerine göre hastaların %66,6'sı MM, %13,3'ü SMM ve %20'si MGUS olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.1). Hastalardan 1 tanesinde ekstremiteler hastalık bulunmuştur. 17 hastada anemi, 11 hastada böbrek komplikasyonu ve 1 hastada hiperkalsemi saptanmıştır. Kemik lezyonları her hastada değerlendirilememiştir. Değerlendirilen 9 hastadan 5 tanesinde bir veya daha fazla kemik lezyonu olduğu görülmüştür.

Tablo 4.1. Hasta grubunun demografik verileri ve klinik bulguları.

Olgu	Cinsiyet	Yaş	Tanı	Ca	BK*	Hemoglobin (g/dl)	Kemik lezyonu
1	E	69	MM	9,4	+	9,6	+
2	K	59	MM	9,13	-	11,7	tetkik yok
3	E	73	MM	8,54	+	11,3	+
4	K	49	SMM	9,1	-	13,4	tetkik yok
5	K	56	MM	8,8	-	12,1	tetkik yok
6	K	55	MM	10,1	-	11,5	+
7	K	61	MM	9,2	+	9,4	+
8	K	69	MM	7,9	-	9,3	tetkik yok
9	E	57	MGUS	9,6	-	15,7	tetkik yok
10	K	57	SMM	8,8	-	11,7	tetkik yok
11	K	64	MM	9	-	13,6	tetkik yok
13	E	56	SMM	9,2	-	13,2	tetkik yok
15	K	66	SMM	9,5	-	10,5	-
16	K	72	MM	10,5	+	10	tetkik yok
17	E	59	MM	10	+	12,1	+
18	K	60	MM	10	-	9,6	tetkik yok
19	K	76	MM	9,4	-	13	tetkik yok

23	K	78	MM	8,4	-	9,3	tetkik yok
24	E	81	MM	9,5	-	9,8	tetkik yok
25	E	63	MGUS	9,6	-	13,1	tetkik yok
26	K	64	MM	9,3	+	10,4	tetkik yok
27	K	58	MGUS	10,1	-	11,3	tetkik yok
29	E	47	MM	9,19	-	8,6	tetkik yok
30	E	58	MM	9,6	+	11,2	-
32	E	62	MM	8,9	+	10,9	-
33	K	68	MGUS	9	+	9,9	tetkik yok
34	K	72	MGUS	9	+	8,9	tetkik yok
35	E	65	MM	9,9	-	14,9	+
36	K	70	MGUS	11,5	+	9,2	tetkik yok
38	K	59	EMD-MM	9,6	-	9,2	tetkik yok

*BK: böbrek komplikasyonu

30 hastadan 28'inin serum immünglobulin değerlerine ulaşılmıştır. Bunlardan 10 tanesinde IgG, 8 tanesinde κ , 6 tanesinde IgA ve 2 tanesinde λ alt tipleri görülmüştür. Bir hasta oligosekretuar bir hasta ise non-sekretuar tip olarak değerlendirilmiştir. Serum serbest κ/λ oranına göre baskın hafif zincir alt tipi 16 hastada κ , 11 hastada λ olarak saptanmıştır (Tablo 4.2).

20 MM hastasının iki tanesinde mikroglobulin düzeyi bakılmadığı için R-ISS hesaplanamamıştır. Kalan 18 hastadan %16,6'sının R-ISS evresi 3, %77,7'sinin 2 ve %11,1'inin 1 olduğu görülmüştür (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Hasta grubunun immünglobulin alt tipleri ve R-ISS evreleri.

Olgu	Tanı	Subtip	Serbest κ/λ	R-ISS
1	MM	IgA	16	2
2	MM	kappa	23,24	bilgi eksik
3	MM	kappa	2822	2
4	SMM	bilgi eksik	12,05	
5	MM	IgG	0,02	2
6	MM	IgA	0,08	3
7	MM	kappa	1450	2
8	MM	kappa	317,65	2
9	MGUS	kappa	18,04	
10	SMM	IgG	7,82	
11	MM	IgG	0,02	2
13	SMM	IgG	0,05	
15	SMM	IgA	0,16	
16	MM	lamda	0,03	3
17	MM	kappa	46,97	2
18	MM	IgA	1,93	1
19	MM	IgG	0,11	2
23	MM	IgG	73,96	2
24	MM	IgG	0,02	2
25	MGUS	kappa	15,97	
26	MM	non-sekretuar	0,6	2
27	MGUS	IgG	4,36	
29	MM	IgG	7,16	2
30	MM	IgA	0,002	bilgi eksik
32	MM	lamda	0,045.10 ⁻⁶	3
33	MGUS	oligosekretuar	2,2	
34	MGUS	IgG	0,65	
35	MM	kappa	553	1
36	MGUS	bilgi eksik		
38	EMD-MM	IgA	0,007	2

4.1.1. Hasta grubunun konvansiyonel ve moleküler sitogenetik bulguları

Hastalardan alınan örneklerde rutin tanı kapsamında konvansiyonel ve moleküler sitogenetik incelemeler yapılmıştır (Tablo 4.3).

Yapılan incelemelerde 5 hastada hiperdiploidi görülmüştür. Konvansiyonel sitogenetik incelemede bir hastada kompleks karyotip, bir hastada X kazanımı, bir hastada Y kaybı saptanmıştır. Moleküler sitogenetik incelemede 12 hastada 13q kaybı veya monozomi 13, 1 hastada del(17p), 4 hastada t(11;14) yokluğunda IGH yeniden düzenlenmesi, 3 hastada t(11;14), 7 hastada trizomi 7 ve 1 hastada monozomi 8 tespit edilmiştir. 10 hastanın FISH incelemesi normaldir.

Tablo 4.3. Hastaların konvansiyonel ve moleküler sitogenetik bulguları.

Olgu	Hiperdiploidi	del(17p)	del(13q)	IGH YD	t(11;14)	trizomi 7	monozomi 8	Diğer
1	-	-	+	-	-	-	-	-
2	-	-	+	-	-	-	-	5' IGH kaybı CCND1 amp. 7q amp.
3	-	-	-	-	+	-	-	IGH amp. FGFR3 amp.
4	-	-	-	-	+	-	-	5' IGH kaybı
5	-	-	+	-	-	-	-	-
6	+	-	+	+	-	+	-	Kompleks karotip IGH artışı
7	+	-	-	-	-	+	-	-
8	+	-	+	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	X kazanımı
11	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	+	-	+	+	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	+	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	CCND1 amp. IGH amp.
19	-	-	-	-	-	+	-	-
23	-	-	+	-	-	-	-	trizomi 8
24	-	-	-	-	-	+	-	trizomi 17

25	-	+	+	-	-	-	-	IGH amp.
26	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-
29	+	-	-	-	-	-	-	-
30	+	-	+	-	+	+	-	-
32	-	-	+	+	-	-	+	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	+	-	-	+	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-
38	-	-	+	+	-	+	-	-

*YD: yeniden düzenlenme, amp.: amplifikasyon

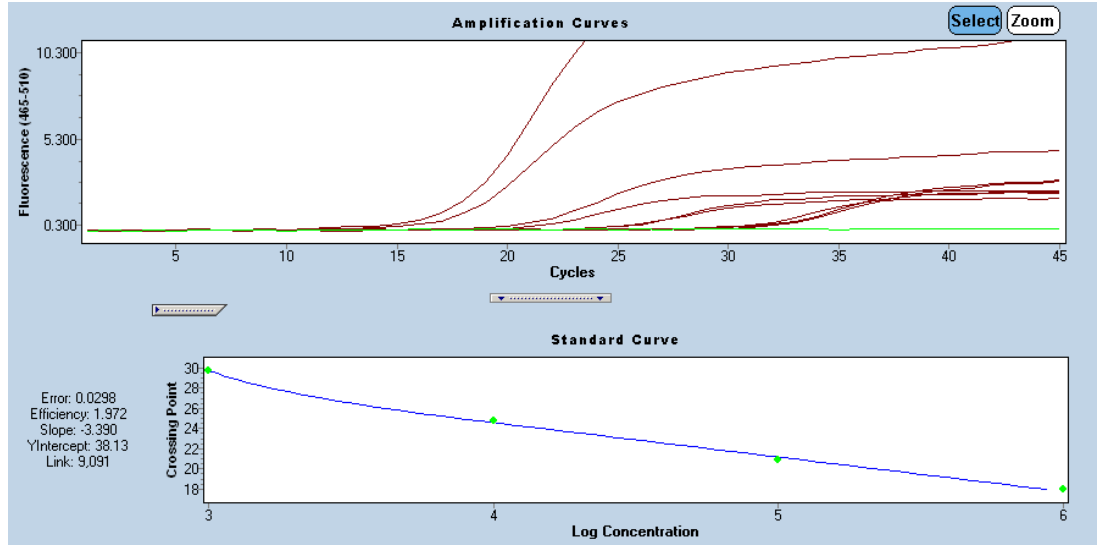
4.2. Kontrol grubu

Çalışma kapsamında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalına Mayıs 2019-Aralık 2019 tarihleri arasında çeşitli sebeplerle başvuran ve ayırıcı tanı için kemik iliği aspirasyonu yapılan 14 hastadan kontrol grubuna dâhil etmek üzere örnek toplanmıştır.

Bu hastalardan 8 tanesi klinik, genetik ve patolojik değerlendirme sonucunda herhangi bir malignite saptanmaması nedeni ile kontrol grubuna seçilmiştir. Seçilen hastaların 4'ü erkek 4'ü kadındır. Kontrollerin en küçüğü 21 en büyüğü 62 yaşında olup yaş ortaları 40 olarak hesaplanmıştır.

4.3. Actin-beta (*ACTB*) ekspresyon çalışması

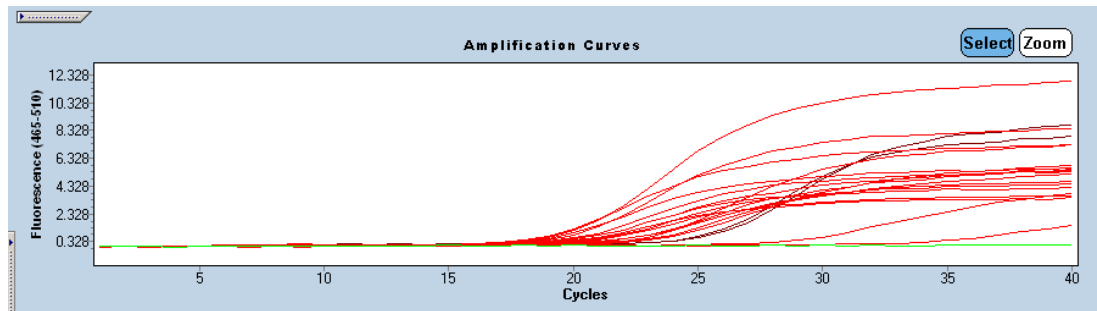
ACTB ekspresyonunun araştırılması amacıyla seri sulandırma ile elde edilen 10^6 ila 10^2 kopya aralığında hedef bölge içeren standartlarla çalışma yapılmıştır. Elde edilen standart eğri grafiği Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Buna göre reaksiyon etkinliği %97.24 olarak hesaplanmıştır. Bu standart eğri hasta ve kontrol grupları arasındaki *ACTB* ekspresyon farkının "Pfaffl yöntemi" ile karşılaştırılması için kullanılmıştır.



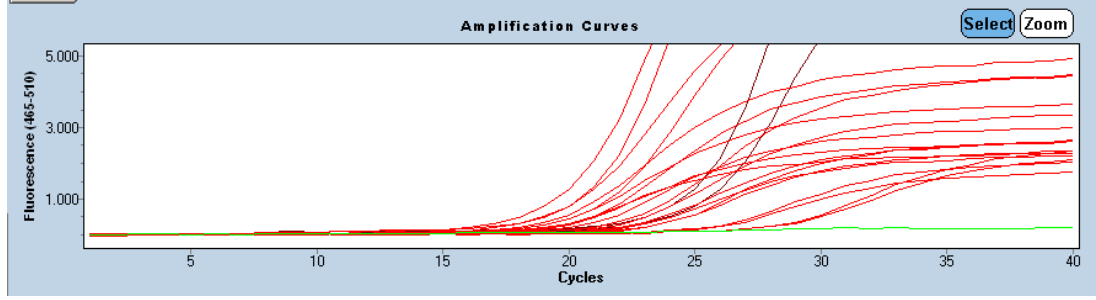
Şekil 4.1. *ACTB* ekspresyon analizi için oluşturulan standartların amplifikasyon eğrisi ve standart eğri grafiği.

4.3.1. Hasta grubunda *ACTB* ekspresyon çalışması

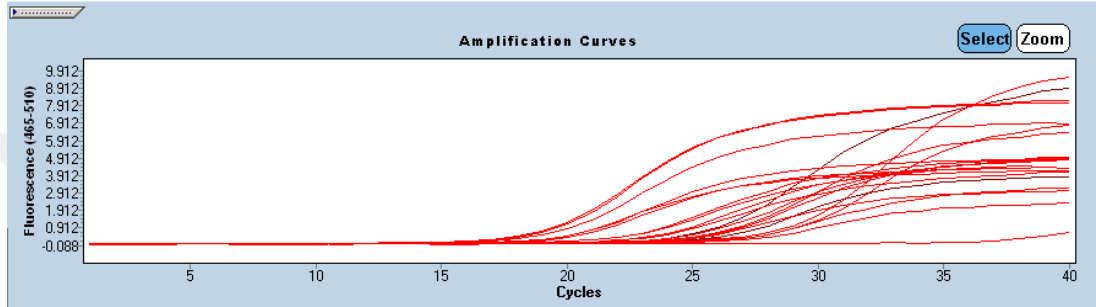
Çalışmaya dahil edilen örnekler arası normalizasyon için kullanılmak üzere 30 hastada *ACTB* ekspresyon çalışması yapılmıştır. Yapılan çalışmalara ait amplifikasyon eğrileri Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Her örnek çift çalışılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen ortalama Ct değerleri Tablo 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Olgu 1'den olgu 10'a kadar hastaların *ACTB* amplifikasyon eğrisi.



Şekil 4.3. Olgu 11'den olgu 27'ye kadar hastaların *ACTB* amplifikasyon eğrisi.



Şekil 4.4. Olgu 29'dan olgu 38'e kadar hastaların *ACTB* amplifikasyon eğrisi.

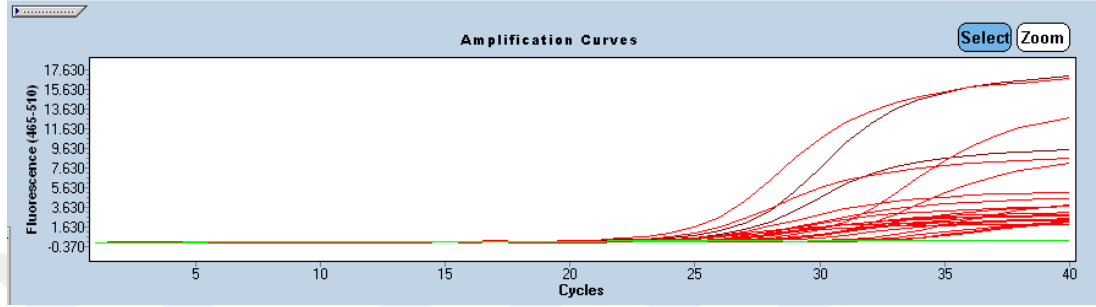
Tablo 4.4. Hastaların *ACTB* için ortalama Ct değerleri.

Olgu	<i>ACTB</i> ortama	Olgu	<i>ACTB</i> ortama
1	23,19	18	20,08
2	21,82	19	19,39
3	19,93	23	18,22
4	22,02	24	20,72
5	29,03	25	25,63
6	19,80	26	22,40
7	18,79	27	23,23
8	19,91	29	19,14
9	20,42	30	19,87
10	20,26	32	19,50
11	20,60	33	23,35
13	28,57	34	22,34
15	19,65	35	27,03
16	22,34	36	24,86
17	21,24	38	29,06

Yapılan *ACTB* ekspresyon çalışması sonucunda hasta grubunun *ACTB* için ortalama Ct değeri 22,07 bulunmuştur.

4.3.1. Kontrol grubunda *ACTB* ekspresyon çalışması

Çalışmaya dahil edilen örnekler arası normalizasyon için kullanılmak üzere 8 kontrolde *ACTB* ekspresyon çalışması yapılmıştır. Yapılan çalışmalara ait amplifikasyon eğrileri Şekil 4.5’de gösterilmiştir. Her örnek çift çalışılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen ortalama Ct değerleri Tablo 4.5’te gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Kontrol grubunun *ACTB* amplifikasyon eğrisi.

Tablo 4.5. Kontrollerin *ACTB* için ortalama Ct değerleri.

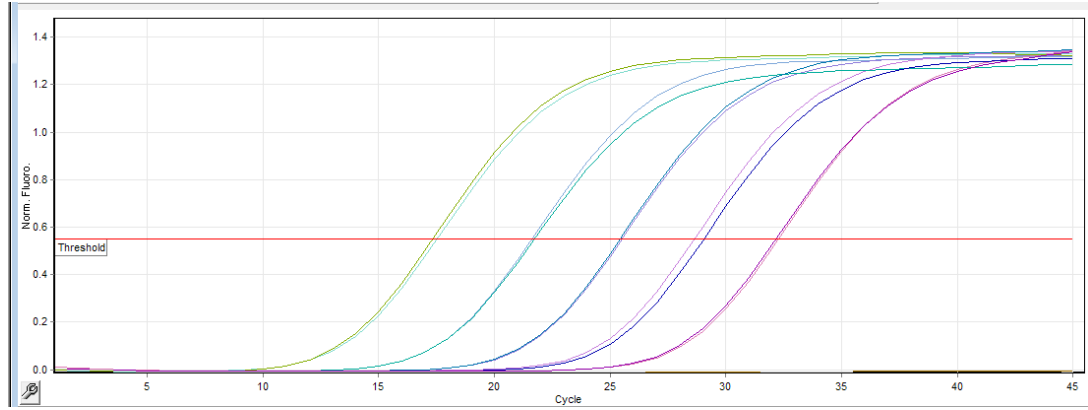
Ölgu	<i>ACTB</i> ortalama
K01	26,42
K02	27,62
K03	25,69
K06	25,79
K07	24,96
K08	30,43
K09	28,85
K12	31,71

Yapılan *ACTB* ekspresyon çalışması sonucunda kontrol grubunun *ACTB* için ortalama Ct değeri 27,68 bulunmuştur.

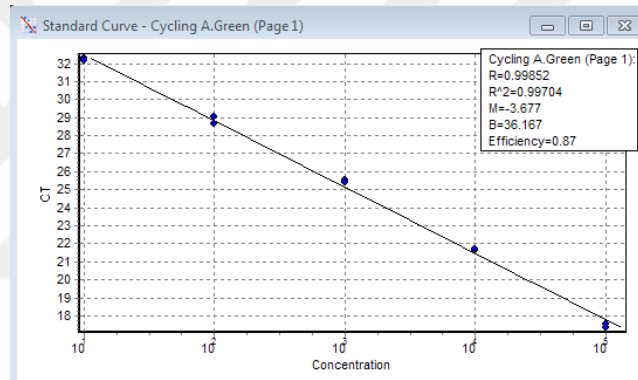
4.4. *LUNAR1* ekspresyon çalışması

LUNAR1 ekspresyonunun araştırılması amacıyla seri sulandırma ile elde edilen 10^5 ila 10 kopya aralığında hedef bölge içeren standartlarla çalışma yapılmıştır. Elde edilen standart amplifikasyon eğrisi ve standart eğri grafiği sırasıyla Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de gösterilmiştir. Buna göre reaksiyon verimi %87,27 olarak hesaplanmıştır. Bu standart eğri hasta ve kontrol grupları

arasındaki *LUNAR1* ekspresyon farkının “Pfaffl yöntemi” ile karşılaştırılması için kullanılmıştır.



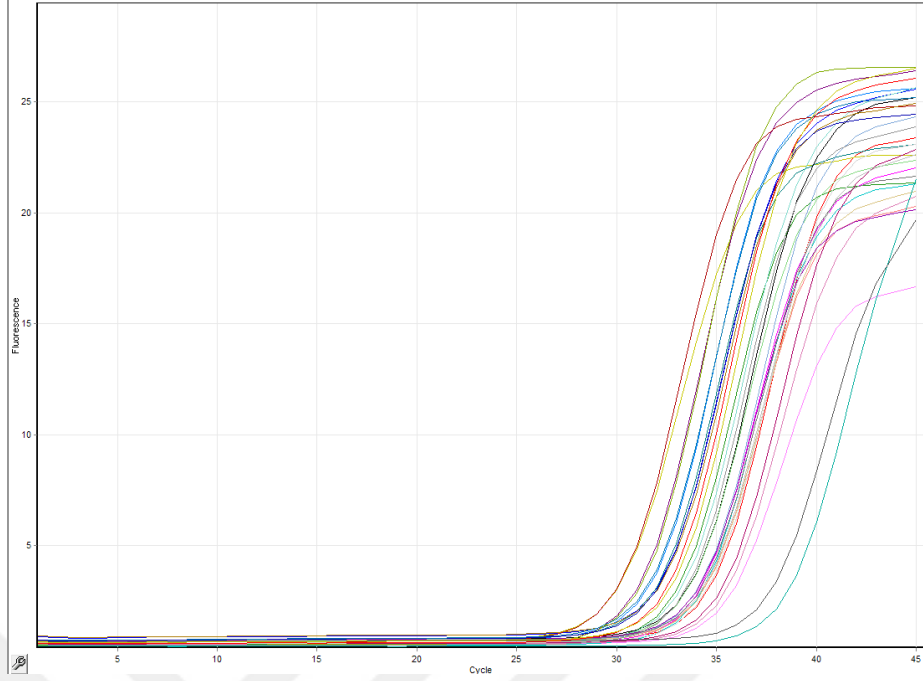
Şekil 4.6. *LUNAR1* ekspresyon analizi için oluşturulan standartların amplifikasyon eğrisi.



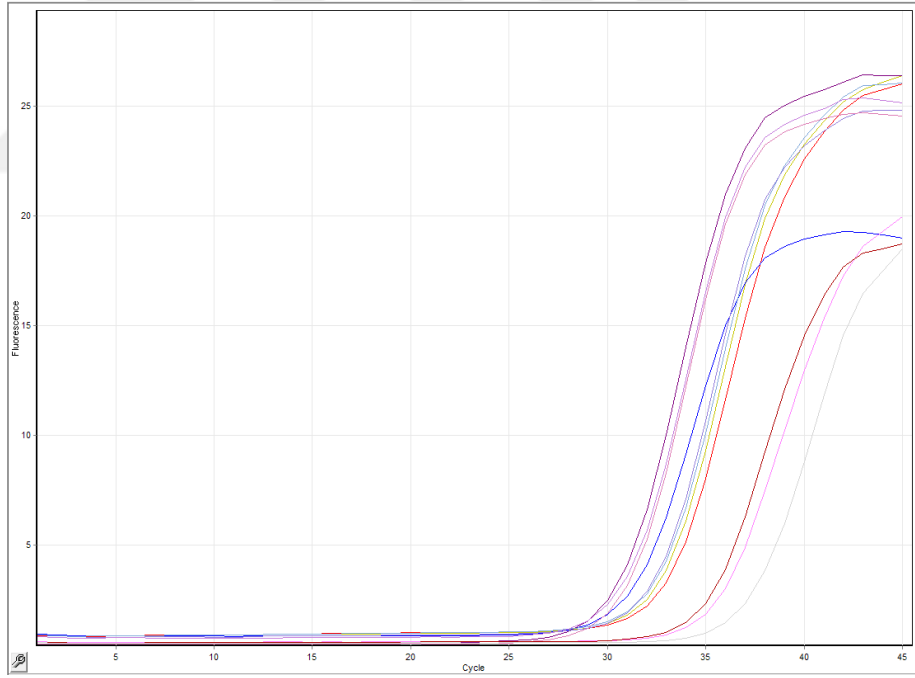
Şekil 4.7. *LUNAR1* ekspresyon analizi için oluşturulan standart eğri.

4.4.1. Hasta grubunda *LUNAR1* ekspresyon çalışması

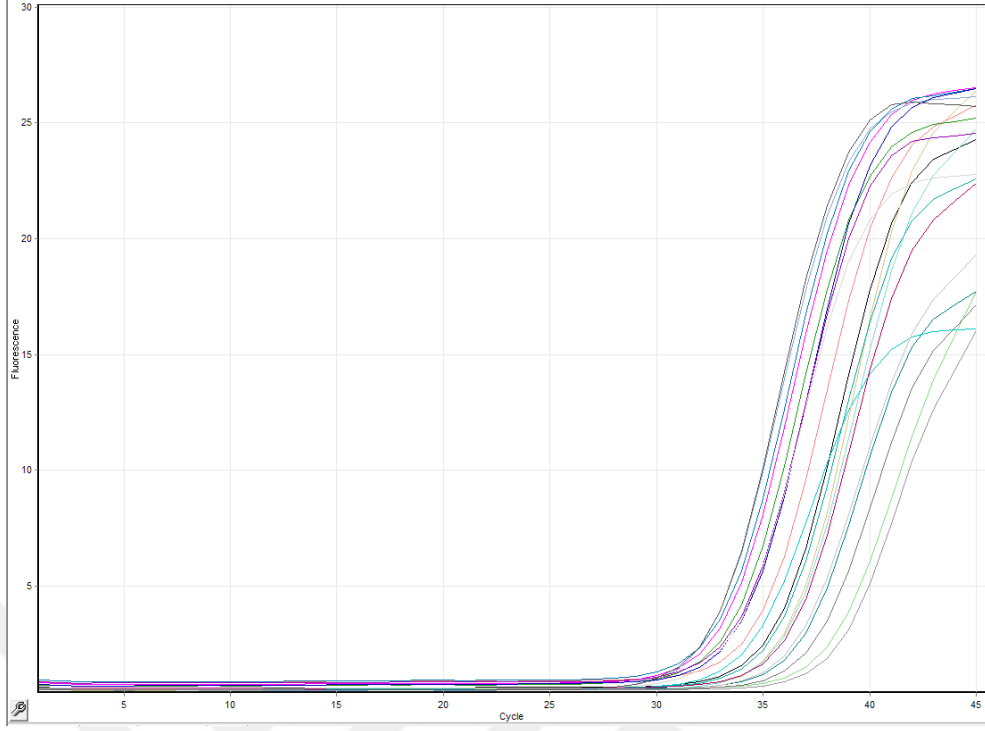
Çalışmaya dâhil edilen 30 hastada *LUNAR1* ekspresyon çalışması yapılmıştır. Yapılan çalışmalara ait amplifikasyon eğrileri Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Her örnek çift çalışılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen ortalama Ct değerleri Tablo 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Olgu 1'den olgu 18'e kadar hastaların *LUNAR1* amplifikasyon eğrisi.



Şekil 4.9. Olgu 19'dan olgu 26'ya kadar hastaların *LUNAR1* amplifikasyon eğrisi.



Şekil 4.10. Olgu 27'den olgu 38'e kadar hastaların *LUNAR1* amplifikasyon eğrisi.

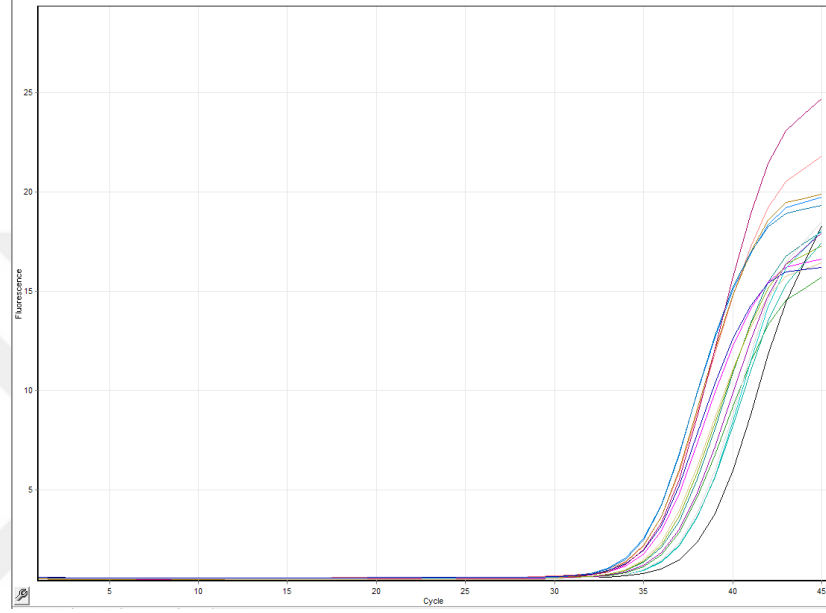
Tablo 4.6. Hastaların *LUNAR1* için ortalama Ct değerleri.

Olgu	<i>LUNAR1</i> ortama	Olgu	<i>LUNAR1</i> ortama
1	31,9	18	30,4
2	26,85	19	29,7
3	29,2	23	29,5
4	28	24	27,85
5	32,2	25	27,55
6	28,6	26	32,15
7	29,05	27	32,95
8	31,05	29	30,7
9	31	30	30,2
10	31,15	32	30,35
11	30,9	33	32,7
13	30,7	34	30,75
15	31,15	35	33,1
16	32,45	36	35
17	29,85	38	29,4

Yapılan *LUNAR1* ekspresyon çalışması sonucunda hasta grubunun *LUNAR1* için ortalama Ct değeri 30,54 bulunmuştur.

4.4.2. Kontrol grubunda *LUNAR1* ekspresyon çalışması

Çalışmaya dâhil edilen 8 kontrolde *LUNAR1* ekspresyon çalışması yapılmıştır. Yapılan çalışmalara ait amplifikasyon eğrileri Şekil 4.11’de gösterilmiştir. Her örnek çift çalışılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen ortalama Ct değerleri Tablo 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Kontrol grubunun *LUNAR1* amplifikasyon eğrisi.

Tablo 4.7. Kontrollerin *LUNAR1* için ortalama Ct değerleri.

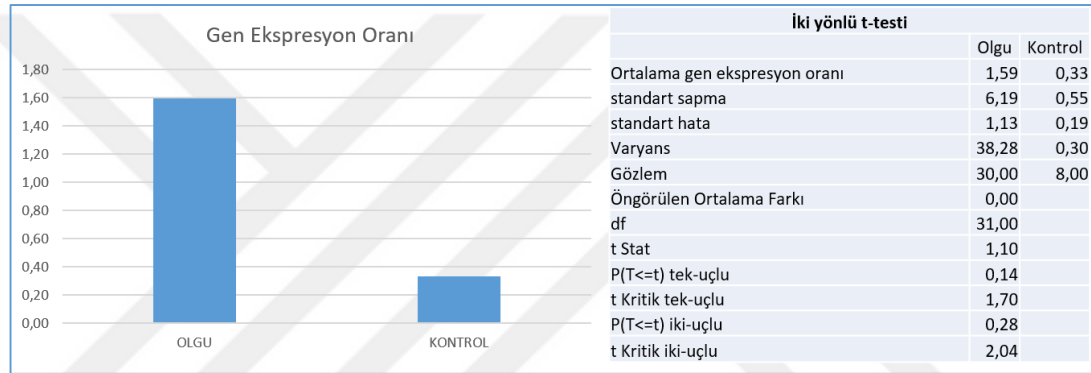
Ölgu	<i>LUNAR1</i> ortama
K01	31,9
K02	32,95
K03	33
K06	32,5
K07	32,2
K08	34,1
K09	33,3
K12	33,3

Yapılan *LUNAR1* ekspresyon çalışması sonucunda kontrol grubunun *LUNAR1* için ortalama Ct değeri 32,9 bulunmuştur.

4.5. Rölatif ekspresyonların gruplar arasında karşılaştırılması

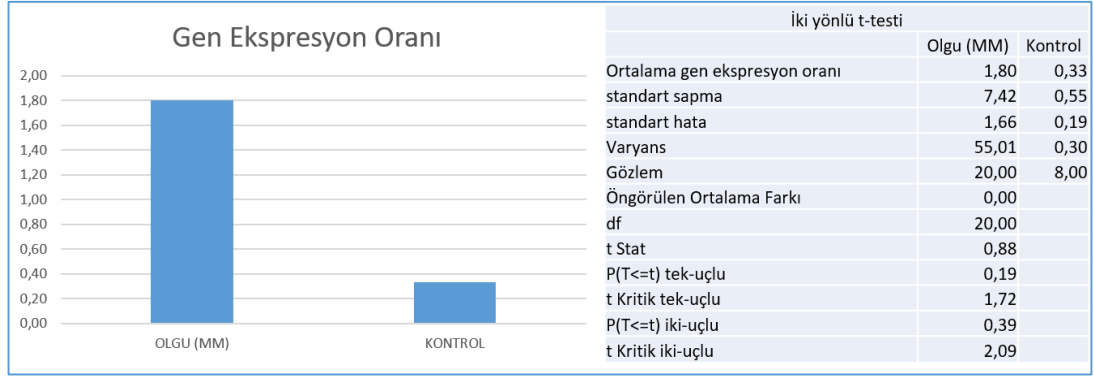
Rölatif ekspresyon oranı yöntem kısmında anlatılan (bakınız 3.6.1) Pfaffl metodu ile hesaplanmıştır.

Öncelikle tüm olgular ile tüm kontroller birbirleri ile karşılaştırılmıştır (şekil 4.12). Olguların ortalama gen ekspresyon oranı 1,59 (standart sapma (standard deviation, SD): 6,19), kontrollerin ise 0,33 (SD: 0,55) bulunmuştur. Hastalar ve kontrollerin ortalama *LUNAR1* gen ekspresyon oranlarını karşılaştırmak amacıyla yapılan t-testi sonucunda gruplar arasında kayda değer bir fark görülmemiştir ($p=0,27$).

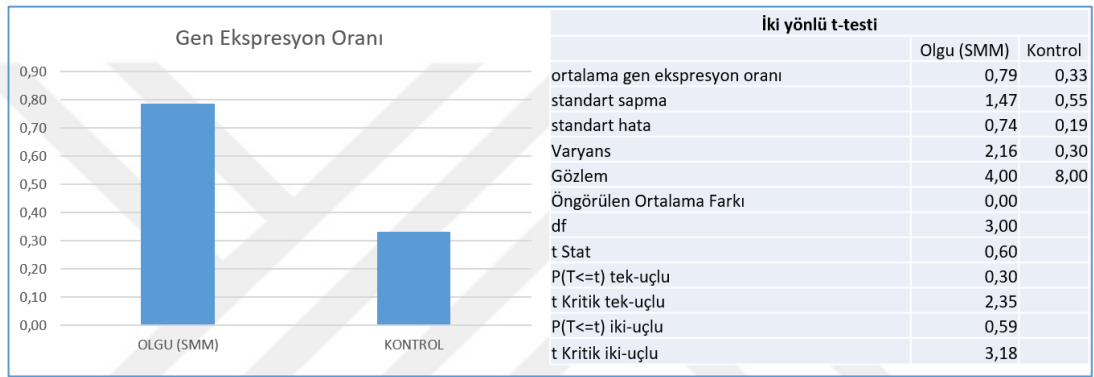


şekil 4.12. Tüm olgular ve tüm kontrollerin gen ekspresyon oranlarının karşılaştırılması.

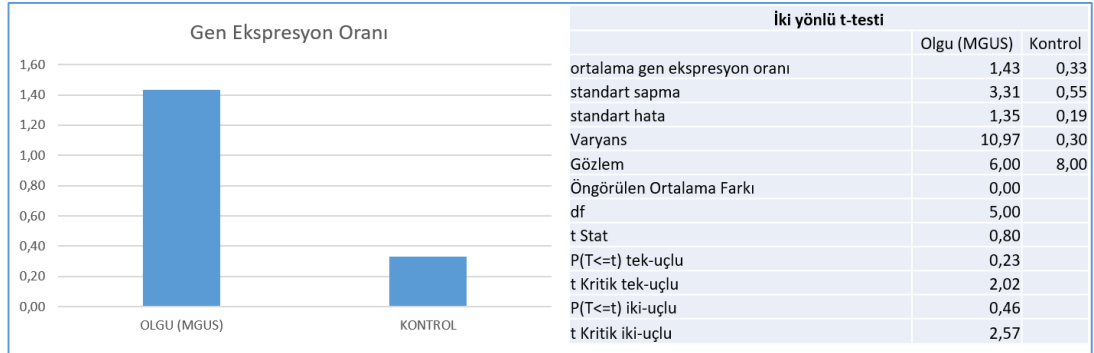
Daha sonra hastalığın MM, SMM ve MGUS alt tipleri ayrı ayrı kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır (şekil 4.13, şekil 4.14, şekil 4.15.). MM, SMM ve MGUS olgularının ortalama gen ekspresyon oranları sırasıyla 1,80 (SD: 7,42), 0,79 (SD: 1,47) ve 1,43 (SD: 3,31) bulunmuştur. Her bir alt tipin ortalama *LUNAR1* gen ekspresyon oranlarını kontrollerle karşılaştırmak amacıyla yapılan t-testi sonucunda gruplar arasında kayda değer bir fark görülmemiştir (MM grubu için $p=0,38$; SMM grubu için $p=0,59$; MGUS grubu için $p=0,45$).



Şekil 4.13. MM olguları ve tüm kontrollerin gen ekspresyon oranlarının karşılaştırılması.



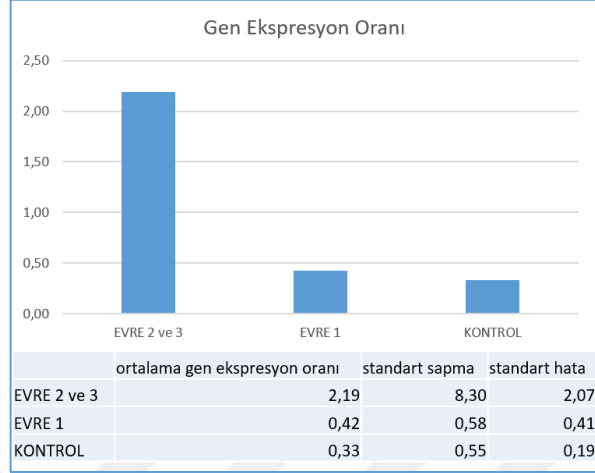
Şekil 4.14. SMM olguları ve tüm kontrollerin gen ekspresyon oranlarının karşılaştırılması.



Şekil 4.15. MGUS olguları ve tüm kontrollerin gen ekspresyon oranlarının karşılaştırılması.

MM hastaları R-ISS evrelerine göre gruplandırılarak evrelere göre gen ekspresyon oranları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.16). Evre 3 hasta sayısının az olması nedeni ile evre 2 ve 3 hastalar aynı grup içerisinde değerlendirilmiştir. Evre 2 ve 3'ün ortalama gen ekspresyon oranı 2,19 (SD: 8,30), evre 1'in ortalama gen ekspresyon oranı 0,42 (SD:0,58) bulunmuştur. Evre 2 ve 3

hastaların ortalama *LUNAR1* gen ekspresyon oranlarını kontrollerle ve evre 1 hastalarla karşılaştırmak amacıyla yapılan t-testi sonucunda gruplar arasında kayda değer bir fark görülmemiştir (sırasıyla $p=0,39$; $p=0,42$) (Şekil 4.17).



Şekil 4.16. R-ISS evrelerine göre MM hastalarının ve kontrollerin gen ekspresyon oranları.

İki yönlü t-testi			İki yönlü t-testi		
	Evre 2 ve 3	Kontrol		Evre 2 ve 3	Evre 1
Ortalama	2,19	0,33	Ortalama	2,19	0,42
Varyans	68,88	0,30	Varyans	68,88	0,33
Gözlem	16,00	8,00	Gözlem	16,00	2,00
Öngörülen Ortalama Farkı	0,00		Öngörülen Ortalama Farkı	0,00	
df	15,00		df	16,00	
t Stat	0,89		t Stat	0,83	
P(T<=t) tek-uçlu	0,19		P(T<=t) tek-uçlu	0,21	
t Kritik tek-uçlu	1,75		t Kritik tek-uçlu	1,75	
P(T<=t) iki-uçlu	0,39		P(T<=t) iki-uçlu	0,42	
t Kritik iki-uçlu	2,13		t Kritik iki-uçlu	2,12	

Şekil 4.17. Evre 2 ve 3 hastaların ortalama gen ekspresyon oranlarının kontrollerle (sol) ve evre 1 hastalarla (sağ) karşılaştırılması.

5. TARTIŞMA

Son yıllarda genomun protein kodlamayan kısımları ile ilgili yapılan çalışmalar lncRNA'ların hem birçok hücresel ve fizyolojik süreçte, hem de başta kanser olmak üzere hastalıkların patogeneğinde önemli olduğunu ortaya koymuştur (95, 97, 104). *LUNAR1*, ilk kez Trimarchi ve arkadaşları tarafından T-ALL hastalarında tanımlanmıştır. Bu çalışmada T-ALL hastalarında Notch ile ilişkili olarak lncRNA *LUNAR1* ifadesinin arttığı; bu artışın da *IGF1R* ifadesinin artışına neden olduğu gösterilmiştir (8). Daha sonra yapılan bir başka çalışmada diffüz büyük B-hücreli lenfoma hastalarından elde edilen doku örneklerinde ve DBBHL hücre serilerinde *LUNAR1* ekspresyonunun sağlıklı kontrollere göre arttığı gösterilmiştir ve artmış *LUNAR1* ekspresyonu kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (9). Literatürde MM hastalarında *LUNAR1* ekspresyonunun araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında 30 yeni tanı almış MM, SMM veya MGUS hastasının *LUNAR1* ifade düzeyleri 8 kontrol ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda çalışmaya dâhil edilen hastaların ortalama *LUNAR1* gen ekspresyon oranının, kontrollerin ortalama *LUNAR1* gen ekspresyon oranına göre daha yüksek olduğu görülmüştür. t-testi istatistiği ile hasta ve kontroller arasında *LUNAR1* ekspresyonu açısından bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.12).

Plazma hücrelerinde primer ve sekonder genetik değişikliklerin birikimi ile MGUS'tan SMM ve MM'ye progresyon görülür (4, 5). Hastalığın farklı aşamalarından hasta örneklerindeki ortalama *LUNAR1* gen ekspresyon oranı kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Buna göre MM, SMM ve MGUS aşamalarından hastalar kontrollerle ayrı ayrı karşılaştırıldığında her bir alt grubun *LUNAR1* gen ekspresyon oranının kontrollerin *LUNAR1* gen ekspresyon oranından daha yüksek olduğu görülmüştür. t-testi istatistiği ile farklı alt tipler ve kontroller arasında *LUNAR1* ekspresyonu açısından bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15).

Hastaların %17'sinde hiperdiploidi görülmüştür. Moleküler sitogenetik incelemede hastaların %40'ında 13q kaybı veya monozomi 13, %27'sinde trizomi 7, %13'ünde t(11;14) yokluğunda IGH yeniden düzenlenmesi,

%10'unda t(11;14) tespit edilmiştir. Hastaların % 33'ünün FISH incelemesi normaldir. Bu sonuçlara göre hastalar, sitogenetik yüksek risk belirteçlerini $\beta 2$ mikroglobulin, albümin ve LDH düzeyleri ile birleştiren R-ISS evrelerine göre gruplandırılmıştır (38). Buna göre özellikle evre 2 ve 3 hastaların *LUNAR1* gen ekspresyon oranının, kontroller ve evre 1 hastaların *LUNAR1* gen ekspresyon oranına göre daha yüksek olduğu görülmüştür. t-testi istatistiği ile bu gruplar ve kontroller arasında *LUNAR1* ekspresyonu açısından bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.16, Şekil 4.17).

Hasta ve kontroller arasında dikkate değer bir ekspresyon farkının bulunmaması örneklemin küçük olması ve farklı alt gruplardan hasta sayısının yetersiz olması ile açıklanabilir. Bu nedenle bu çalışmanın devamında örnek sayısının artırılması hedeflenmiştir.

LUNAR1, 15q26.3'te yerleşiktir ve Ensembl'da tanımlı 9 farklı transkripti bulunmaktadır (166). Farklı transkriptlerin örtüşen dizi bölgeleri alternatif ayıklanmaya bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir. Buna ek olarak, NCBI-Gene'de paylaşılan transkriptle Ensembl'daki transkriptler arasında da farklılıklar bulunmaktadır (167). Bu transkriptlerin örtüşen bölgeleri ve kullanılan primer çifti ile ilişkisi Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Transkriptler arasındaki farklılıklar ve MM'de *LUNAR1* ekspresyonu için tanımlanmış sık gözlenen transkript bilgisi olmaması nedeni ile, literatürden kaynaklı primer tasarımı (Trimarchi ve arkadaşları,2014) da dahil olmak üzere primer oluşturma ve reaksiyonların optimizasyonunda zorluklarla karşılaşmıştır (8). Bu nedenle transkriptlerin çoğunu hedefleyebilecek primer çiftleri tasarlanmıştır. Ancak, bu primer çiftleri ile de yüksek reaksiyon etkinliği elde edilememiştir (Şekil 4.7). Bu çalışmada, PCR etkinliklerinde beklenen düzeyin sağlanamaması ve optimizasyonda yaşanan zorluklar bizi gen ekspresyon oranlarının hesaplanmasında reaksiyon etkinliklerini de göz önünde bulunduran Pfaffl yöntemini kullanmaya yöneltmiştir.

LUNAR1 ile ilgili çalışmaların çok az sayıda olması ve ilgili transkriptlerinin iyi tanımlanmamış olması nedeniyle bu genin tüm transkriptlerine özgü primerler kullanılarak bu ekspresyon çalışmasının geliştirilebileceği önerilebilir. Farklı

hücre tipleri ve hastalık gruplarında *LUNAR1* ekspresyon düzeylerinin çalışılması bu genin işlevi ile ilgili açıklayıcı olabilir.

NONCODE veri tabanına göre insanda tanımlı 172.216 lncRNA bulunmaktadır (98). lncRNA'ların birçoğunun iyi tanımlanmamış olması ve her birini ayrı ayrı araştırmanın zorluğu göz önünde bulundurulduğunda bu çalışmaların yeni nesil tekniklerle çok sayıda hedef belirlenerek yapılması daha etkin olabilir. Çalışmamızda ele alınan multiple myeloma-tümör mikroçevresi etkileşimi bağlamında ileride daha fazla hedef genin çalışılması planlanmıştır.

Çalışmamız malign plazma hücrelerinde lncRNA *LUNAR1* ekspresyonunun araştırıldığı ilk çalışma olması açısından önemlidir. *LUNAR1* MM ilişkisi için daha fazla sayıda hastada yapılacak çalışmalar moleküler etyolojinin aydınlatılmasına katkıda bulunacaktır.

6. SONUÇLAR

- 1- Çalışmada değerlendirilen tüm hastaların ortalama gen ekspresyon oranı 1,59 (SD: 6,19); kontrollerin ise 0,33 (SD: 0,55) bulunmuştur. t-testi istatistiği ile hasta ve kontroller arasında *LUNAR1* ekspresyonu açısından bir fark saptanmamıştır.
- 2- MM, SMM ve MGUS olgularının ortalama gen ekspresyon oranları sırasıyla 1,80 (SD: 7,42), 0,79 (SD: 1,47) ve 1,43 (SD: 3,31) bulunmuştur. t-testi istatistiği ile farklı alt tipler ve kontroller arasında *LUNAR1* ekspresyonu açısından bir fark saptanmamıştır.
- 3- Hastalar R-ISS evrelerine göre gruplandırıldığında Evre 2 ve 3'ün ortalama gen ekspresyon oranı 2,19 (SD: 8,30), evre 1'in ortalama gen ekspresyon oranı 0,42 (SD:0,58) bulunmuştur. t-testi istatistiği ile evreler birbirleri ve kontroller ile karşılaştırıldığında gruplar arasında fark bulunmamıştır.
- 4- *LUNAR1* transkriptlerinin çok iyi tanımlanmamış olması nedeni ile yöntemin optimizasyonunda yaşanan güçlükler *LUNAR1* özelinde protein kodlamayan RNA'ların farklı hücre ve hastalık gruplarında araştırılmasının önemini ortaya çıkarmıştır. Bu çalışmanın devamında tümör mikroçevresi ve multiple myeloma arasındaki etkileşimde önemli olabilecek farklı hedef genlere yönelik araştırma planlanmıştır.
- 5- Çalışmamız *LUNAR1* ekspresyonunun malign plazma hücrelerinde araştırıldığı ilk çalışmadır. 30 yeni tanı almış MM, SMM veya MGUS hastasının *LUNAR1* ifade düzeyleri 8 kontrol ile real time reverse transkriptaz yöntemi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Ancak yapılan analizlerde *LUNAR1* ekspresyonu artışı ile MM arasında dikkate değer bir ilişki bulunamamıştır. Multiple myeloma patogenezinde Notch yolağı aktivasyonunun etkisi düşünüldüğünde, bir Notch hedefi olan *LUNAR1*'in hastalıktaki rolünü anlamak açısından daha fazla sayıda hastada ve hücre serilerinde bu lncRNA'nın potansiyel etkisinin araştırılması anlamlı olacaktır.

ÖZET

Multiple myeloma (MM), post-germinal B hücre kökenli plazma hücrelerinin malignitesidir. İkinci en sık hematolojik malignite olan MM'de tümöröenez birbirini izleyen genetik ve epigenetik olaylar (IGH translokasyonları, hiperdiploidi, kopya sayısı değışiklikleri, DNA hipometilasyonu gibi) ve tümör mikro-çevresindeki değışiklikler sayesinde gerçekleşir.

Yapılan çalışmalar multiple myeloma progresyonunda plazma hücrelerinin kemik nişe yerleşmesi ve tümör mikro-çevre değışikliklerinin önemini göstermiştir. Bu süreçte adezyon, invazyon, anjiogenez, ilaç direnci, immune sistemden kaçış ve kemik rezorpsiyonu gibi tümör ilişkili aşamalarda Notch yolağı aktivasyonunun etkisi gösterilmiştir.

LUNAR1 yakın zamanda T-ALL hastalarında tanımlanan, Notch-ilişkili bir long non-coding RNA'dır. Daha sonra yapılan bir başka çalışmada diffüz büyük B-hücreli lenfoma hastalarında da *LUNAR1* ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir.

MM progresyonunda Notch yolağı aktivasyonunun önemi göz önünde bulundurulduğunda, *LUNAR1* ekspresyon düzeyinin artmış olmasının MM takibi ve prognozu açısından önemli bir belirteç olabileceğı düşünülmüştür. Bu çalışmada 30 adet yeni tanı MM, SMM ve MGUS hastasında 8

kontrole göre *LUNAR1* ekspresyonunun farkı araştırılmıştır.

Araştırma sonucunda her üç alt tipte *LUNAR1* ekspresyonun kontrollere göre artmış olduğu görülmüştür. Ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Plazma hücre neoplazilerinde *LUNAR1* ekspresyonunun belirlenmesi için daha çok sayıda hasta ile çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler

"Multiple myeloma", "long non-coding RNA", "*LUNAR1*", "tümör mikroçevresi"

SUMMARY

Multiple myeloma (MM) is a malignancy of plasma cells derived from the transformation of post-germinal-center B cells. It is the second common hematological malignancy and results from consecutive genetic events - including *IGH* translocations, hyperdiploidy, copy number abnormalities and DNA hypomethylation- and changes in tumor microenvironment.

Several studies showed that tumor microenvironment changes and migration of tumor cells to bone niche are important for the progression of MM. It is also revealed that Notch pathway activation is a key player for carcinogenic events such as adhesion, invasion, angiogenesis, drug resistance, bone resorption and immune escape.

LUNAR1 is a Notch-pathway-related lncRNA which is recently identified in T-ALL patients. In this study, Notch activation increased the expression of *LUNAR1* which enhanced *IGR1R* expression in both tumor cell lines and in vivo patient samples. Yet another study showed an increase in the expression of *LUNAR1* in diffuse large B cell lymphoma patients.

We suggested that increased *LUNAR1* expression may be indicative for MM prognosis, considering the role of Notch pathway in the disease progression. In this study, *LUNAR1* expression of 30 newly diagnosed MM, SMM or MGUS patients were investigated compared to 8 healthy controls.

All three subtypes of patients showed increased lncRNA *LUNAR1* expression compared to healthy controls. However, these results were not statistically significant. Further studies, with a larger sample size, are needed to determine the levels of *LUNAR1* expression definitively in plasma cell neoplasia.

Key Words

“Multiple myeloma”, “long non-coding RNA”, “*LUNAR1*”, “tumor microenvironment”, “Notch pathway”

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2017;67(1):7-30.
2. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al., editors. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. Mayo Clinic proceedings; 2003: Elsevier.
3. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. Nature Reviews Cancer. 2002;2(3):175-87.
4. Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, van Duin M, Sonneveld P, Mateos M-V, et al. Multiple myeloma. Nature Reviews Disease Primers. 2017;3:17046.
5. Röllig C, Knop S, Bornhäuser M. Multiple myeloma. The Lancet. 2015;385(9983):2197-208.
6. Ma L, Bajic VB, Zhang Z. On the classification of long non-coding RNAs. RNA biology. 2013;10(6):924-33.
7. Chevli KK, Duff M, Walter P, Yu C, Capuder B, Elshafei A, et al. Urinary PCA3 as a predictor of prostate cancer in a cohort of 3,073 men undergoing initial prostate biopsy. The Journal of urology. 2014;191(6):1743-8.
8. Trimarchi T, Bilal E, Ntziachristos P, Fabbri G, Dalla-Favera R, Tsigiris A, et al. Genome-wide mapping and characterization of Notch-regulated long noncoding RNAs in acute leukemia. Cell. 2014;158(3):593-606.
9. Peng W, Feng J. Long noncoding RNA LUNAR1 associates with cell proliferation and predicts a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. Biomedicine & pharmacotherapy. 2016;77:65-71.
10. Palumbo A, Anderson K. Multiple Myeloma. New England Journal of Medicine. 2011;364(11):1046-60.
11. Cowan AJ, Allen C, Barac A, Basaleem H, Bensenor I, Curado MP, et al. Global burden of multiple myeloma: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. JAMA oncology. 2018;4(9):1221-7.
12. Ferlay J EM, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2018 [Available from: <https://gco.iarc.fr/today>].

13. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(6):394-424.
14. Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). GBD Compare Data Visualization. Seattle, WA: IHME, University of Washington 2018 [26.03.2019]. Available from: <http://vizhub.healthdata.org/gbd-compare>.
15. ELİAÇIK E, BÜYÜKAŞIK Y. Multipl Myelom. *Türkiye Klinikleri Hematology-Special Topics*. 2013;6(4):10-4.
16. Usmani SZ, Heuck C, Mitchell A, Szymonifka J, Nair B, Hoering A, et al. Extramedullary disease portends poor prognosis in multiple myeloma and is over-represented in high-risk disease even in the era of novel agents. *Haematologica*. 2012;97(11):1761-7.
17. Short KD, Rajkumar SV, Larson D, Buadi F, Hayman S, Dispenzieri A, et al. Incidence of extramedullary disease in patients with multiple myeloma in the era of novel therapy, and the activity of pomalidomide on extramedullary myeloma. *Leukemia*. 2011;25:906.
18. Rajkumar SV, Kyle R, Connor R. Clinical features, laboratory manifestations, and diagnosis of multiple myeloma. *UpToDate Waltham: UpToDate*. 2011.
19. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos M-V, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The lancet oncology*. 2014;15(12):e538-e48.
20. Rajkumar SV, Kumar S, editors. *Multiple myeloma: diagnosis and treatment*. Mayo Clinic proceedings; 2016: Elsevier.
21. Van de Donk N, Mutis T, Poddighe P, Lokhorst H, Zweegman S. Diagnosis, risk stratification and management of monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *International journal of laboratory hematology*. 2016;38:110-22.
22. van de Donk NW, Palumbo A, Johnsen HE, Engelhardt M, Gay F, Gregersen H, et al. The clinical relevance and management of monoclonal gammopathy of undetermined significance and related disorders:

recommendations from the European Myeloma Network. *Haematologica*. 2014;99(6):984-96.

23. Sigurdardottir EE, Turesson I, Lund SH, Lindqvist EK, Mailankody S, Korde N, et al. The role of diagnosis and clinical follow-up of monoclonal gammopathy of undetermined significance on survival in multiple myeloma. *JAMA oncology*. 2015;1(2):168-74.

24. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *New England Journal of Medicine*. 2002;346(8):564-9.

25. Blade J, Lopez-Guillermo A, Rozman C, Cervantes F, Salgado C, Aguilar JL, et al. Malignant transformation and life expectancy in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *British journal of haematology*. 1992;81(3):391-4.

26. Cesana C, Klersy C, Barbarano L, Nosari AM, Crugnola M, Pungolino E, et al. Prognostic factors for malignant transformation in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology*. 2002;20(6):1625-34.

27. Kyle RA, Durie BG, Rajkumar SV, Landgren O, Blade J, Merlini G, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia*. 2010;24(6):1121-7.

28. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nature Reviews Cancer*. 2012;12(5):335-48.

29. Chretien M-L, Corre J, Lauwers-Cances V, Magrangeas F, Cleynen A, Yon E, et al. Understanding the role of hyperdiploidy in myeloma prognosis: which trisomies really matter? *Blood*. 2015;126(25):2713-9.

30. Mikhael JR, Dingli D, Roy V, Reeder CB, Buadi FK, Hayman SR, et al. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines 2013. *Mayo Clinic proceedings*. 2013;88(4):360-76.

31. Rajkumar SV. Updated Diagnostic Criteria and Staging System for Multiple Myeloma. American Society of Clinical Oncology educational book American Society of Clinical Oncology Annual Meeting. 2016;35:e418-23.
32. Rajan AM, Rajkumar SV. Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice. Blood Cancer J. 2015;5:e365.
33. Robiou du Pont S, Cleyneen A, Fontan C, Attal M, Munshi N, Corre J, et al. Genomics of multiple myeloma. Journal of Clinical Oncology. 2017;35(9):963-7.
34. Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, Cibulskis K, Sougnez C, Schinzel AC, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. Nature. 2011;471(7339):467.
35. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, Van Loo P, Alexandrov LB, Martincorena I, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. Nature communications. 2014;5:2997.
36. Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, Murison A, Begum DB, Dahir NB, et al. Mutational spectrum, copy number changes, and outcome: results of a sequencing study of patients with newly diagnosed myeloma. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2015;33(33):3911.
37. Fakhri B, Vij R. Clonal evolution in multiple myeloma. Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia. 2016;16:S130-S4.
38. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2015;33(26):2863-9.
39. Alzrigat M, Párraga AA, Jernberg-Wiklund H, editors. Epigenetics in multiple myeloma: From mechanisms to therapy. Seminars in cancer biology; 2018: Elsevier.
40. Walker BA, Wardell CP, Chiecchio L, Smith EM, Boyd KD, Neri A, et al. Aberrant global methylation patterns affect the molecular pathogenesis and prognosis of multiple myeloma. Blood. 2011;117(2):553-62.

41. Agirre X, Castellano G, Pascual M, Heath S, Kulis M, Segura V, et al. Whole-epigenome analysis in multiple myeloma reveals DNA hypermethylation of B cell-specific enhancers. *Genome research*. 2015;25(4):478-87.
42. Keats JJ, Reiman T, Maxwell CA, Taylor BJ, Larratt LM, Mant MJ, et al. In multiple myeloma, t (4; 14)(p16; q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. *Blood*. 2003;101(4):1520-9.
43. Croonquist PA, Van Ness B. The polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is an oncogene that influences myeloma cell growth and the mutant ras phenotype. *Oncogene*. 2005;24(41):6269.
44. Pawlyn C, Bright M, Buros A, Stein C, Walters Z, Aronson L, et al. Overexpression of EZH2 in multiple myeloma is associated with poor prognosis and dysregulation of cell cycle control. *Blood cancer journal*. 2017;7(3):e549.
45. Alzrigat M, Párraga AA, Agarwal P, Zureigat H, Österborg A, Nahi H, et al. EZH2 inhibition in multiple myeloma downregulates myeloma associated oncogenes and upregulates microRNAs with potential tumor suppressor functions. *Oncotarget*. 2017;8(6):10213.
46. Chen L, Li C, Zhang R, Gao X, Qu X, Zhao M, et al. miR-17-92 cluster microRNAs confers tumorigenicity in multiple myeloma. *Cancer letters*. 2011;309(1):62-70.
47. Pichiorri F, Suh S-S, Ladetto M, Kuehl M, Palumbo T, Drandi D, et al. MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(35):12885-90.
48. Roccaro AM, Sacco A, Thompson B, Leleu X, Azab AK, Azab F, et al. MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma. *Blood*. 2009;113(26):6669-80.
49. Chim C, Wong K, Qi Y, Loong F, Lam W, Wong L, et al. Epigenetic inactivation of the miR-34a in hematological malignancies. *Carcinogenesis*. 2010;31(4):745-50.

50. Di Martino MT, Gullà A, Cantafio MEG, Lionetti M, Leone E, Amodio N, et al. In vitro and in vivo anti-tumor activity of miR-221/222 inhibitors in multiple myeloma. *Oncotarget*. 2013;4(2):242.
51. Braggio E, Maiolino A, Gouveia ME, Magalhães R, Souto Filho JT, Garnica M, et al. Methylation status of nine tumor suppressor genes in multiple myeloma. *International journal of hematology*. 2010;91(1):87-96.
52. Martínez-Baños D, Sánchez-Hernández B, Jiménez G, Barrera-Lumbreras G, Barrales-Benítez O. Global methylation and promoter-specific methylation of the P16, SOCS-1, E-cadherin, P73 and SHP-1 genes and their expression in patients with multiple myeloma during active disease and remission. *Experimental and therapeutic medicine*. 2017;13(5):2442-50.
53. Kaiser MF, Johnson DC, Wu P, Walker BA, Brioli A, Mirabella F, et al. Global methylation analysis identifies prognostically important epigenetically inactivated tumor suppressor genes in multiple myeloma. *Blood*. 2013;122(2):219-26.
54. Yu H, Yang L, Fu Y, Gao M, Tian L. Clinicopathological significance of the p16 hypermethylation in multiple myeloma, a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(47):83270.
55. Wei B, Yang S, Zhang B, Feng Y. Clinicopathological significance of p15 promoter hypermethylation in multiple myeloma: a meta-analysis. *OncoTargets and therapy*. 2016;9:4015.
56. Ghobrial IM, Detappe A, Anderson KC, Steensma DP. The bone-marrow niche in MDS and MGUS: implications for AML and MM. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2018.
57. Alsayed Y, Ngo H, Runnels J, Leleu X, Singha UK, Pitsillides CM, et al. Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12)–dependent migration and homing in multiple myeloma. *Blood*. 2007;109(7):2708-17.
58. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Gavriatopoulou M, Dimopoulos MA. Pathogenesis of bone disease in multiple myeloma: from bench to bedside. *Blood cancer journal*. 2018;8(1):7.

59. Qiang Y-W, Kopantzev E, Rudikoff S. Insulinlike growth factor-I signaling in multiple myeloma: downstream elements, functional correlates, and pathway cross-talk. *Blood*. 2002;99(11):4138-46.
60. Nefedova Y, Cheng P, Alsina M, Dalton WS, Gabrilovich DI. Involvement of Notch-1 signaling in bone marrow stroma-mediated de novo drug resistance of myeloma and other malignant lymphoid cell lines. *Blood*. 2004;103(9):3503-10.
61. Roccaro AM, Sacco A, Maiso P, Azab AK, Tai Y-T, Reagan M, et al. BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(4):1542.
62. Tian E, Zhan F, Walker R, Rasmussen E, Ma Y, Barlogie B, et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2003;349(26):2483-94.
63. Kawano Y, Moschetta M, Manier S, Glavey S, Gorgun GT, Roccaro AM, et al. Targeting the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Immunological reviews*. 2015;263(1):160-72.
64. Dairaghi DJ, Oyajobi BO, Gupta A, McCluskey B, Miao S, Powers JP, et al. CCR1 blockade reduces tumor burden and osteolysis in vivo in a mouse model of myeloma bone disease. *Blood*. 2012;120(7):1449-57.
65. Tai Y-T, Acharya C, An G, Moschetta M, Zhong MY, Feng X, et al. APRIL and BCMA promote human multiple myeloma growth and immunosuppression in the bone marrow microenvironment. *Blood*. 2016;127(25):3225-36.
66. Raje NS, Bhatta S, Terpos E. Role of the RANK/RANKL Pathway in Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research*. 2019;25(1):12-20.
67. Ramachandran IR, Martner A, Pisklakova A, Condamine T, Chase T, Vogl T, et al. Myeloid-derived suppressor cells regulate growth of multiple myeloma by inhibiting T cells in bone marrow. *The Journal of immunology*. 2013;190(7):3815-23.
68. Görgün GT, Whitehill G, Anderson JL, Hideshima T, Maguire C, Laubach J, et al. Tumor-promoting immune-suppressive myeloid-derived

suppressor cells in the multiple myeloma microenvironment in humans. *Blood*. 2013;121(15):2975-87.

69. Favaloro J, Liyadipitiya T, Brown R, Yang S, Suen H, Woodland N, et al. Myeloid derived suppressor cells are numerically, functionally and phenotypically different in patients with multiple myeloma. *Leukemia & lymphoma*. 2014;55(12):2893-900.

70. Ghannam S, Pène J, Torcy-Moquet G, Jorgensen C, Yssel H. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *The Journal of Immunology*. 2010;185(1):302-12.

71. Rosenblatt J, Avigan D. Targeting the PD-1/PD-L1 axis in multiple myeloma: a dream or a reality? *Blood*. 2017;129(3):275-9.

72. Glavey SV, Naba A, Manier S, Clauser K, Tahri S, Park J, et al. Proteomic characterization of human multiple myeloma bone marrow extracellular matrix. *Leukemia*. 2017;31(11):2426.

73. Yang Y, Yaccoby S, Liu W, Langford JK, Pumphrey CY, Theus A, et al. Soluble syndecan-1 promotes growth of myeloma tumors in vivo. *Blood*. 2002;100(2):610-7.

74. Bray SJ. Notch signalling in context. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2016;17(11):722.

75. Braune E-B, Lendahl U. Notch—a goldilocks signaling pathway in disease and cancer therapy. *Discovery medicine*. 2016;21(115):189-96.

76. Luca VC, Jude KM, Pierce NW, Nachury MV, Fischer S, Garcia KC. Structural basis for Notch1 engagement of Delta-like 4. *Science*. 2015;347(6224):847-53.

77. Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(9):678.

78. Wilson JJ, Kovall RA. Crystal structure of the CSL-Notch-Mastermind ternary complex bound to DNA. *Cell*. 2006;124(5):985-96.

79. Colombo M, Mirandola L, Platonova N, Apicella L, Basile A, Figueroa A, et al. Notch-directed microenvironment reprogramming in myeloma: a single path to multiple outcomes. *Leukemia*. 2013;27(5):1009-18.

80. Gordon WR, Zimmerman B, He L, Miles LJ, Huang J, Tiyanont K, et al. Mechanical allostery: evidence for a force requirement in the proteolytic activation of Notch. *Developmental cell*. 2015;33(6):729-36.
81. Mirandola L, Comi P, Cobos E, Kast WM, Chiriva-Internati M, Chiaramonte R. Notch-ing from T-cell to B-cell lymphoid malignancies. *Cancer letters*. 2011;308(1):1-13.
82. Houde C, Li Y, Song L, Barton K, Zhang Q, Godwin J, et al. Overexpression of the NOTCH ligand JAG2 in malignant plasma cells from multiple myeloma patients and cell lines. *Blood*. 2004;104(12):3697-704.
83. Škrtić A, Korać P, Krišto DR, Stojisavljević RA, Ivanković D, Dominis M. Immunohistochemical analysis of NOTCH1 and JAGGED1 expression in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Human pathology*. 2010;41(12):1702-10.
84. Takeuchi T, Adachi Y, Ohtsuki Y. Skeletrophin, a novel ubiquitin ligase to the intracellular region of Jagged-2, is aberrantly expressed in multiple myeloma. *The American journal of pathology*. 2005;166(6):1817-26.
85. Chiron D, Maïga S, Descamps G, Moreau P, Le Gouill S, Marionneau S, et al. Critical role of the NOTCH ligand JAG2 in self-renewal of myeloma cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2012;48(4):247-53.
86. Hoshino N, Katayama N, Shibasaki T, Ohishi K, Nishioka J, Masuya M, et al. A novel role for Notch ligand Delta-1 as a regulator of human Langerhans cell development from blood monocytes. *Journal of leukocyte biology*. 2005;78(4):921-9.
87. Mirandola L, Chiriva-Internati M, Montagna D, Locatelli F, Zecca M, Ranzani M, et al. Notch1 regulates chemotaxis and proliferation by controlling the CC-chemokine receptors 5 and 9 in T cell acute lymphoblastic leukaemia. *The Journal of pathology*. 2012;226(5):713-22.
88. Maerki S, Ceredig R, Rolink A. Induction of chemokine receptor expression during early stages of T cell development. *Immunology letters*. 2006;104(1-2):110-7.
89. Wang Y-C, Hu X-B, He F, Feng F, Wang L, Li W, et al. Lipopolysaccharide-induced maturation of bone marrow-derived dendritic cells

is regulated by notch signaling through the up-regulation of CXCR4. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(23):15993-6003.

90. Mirandola L, Apicella L, Colombo M, Yu Y, Berta D, Platonova N, et al. Anti-Notch treatment prevents multiple myeloma cells localization to the bone marrow via the chemokine system CXCR4/SDF-1. *Leukemia*. 2013;27(7):1558-66.

91. Muguruma Y, Yahata T, Warita T, Hozumi K, Nakamura Y, Suzuki R, et al. Jagged1-induced Notch activation contributes to the acquisition of bortezomib resistance in myeloma cells. *Blood cancer journal*. 2017;7(12):650.

92. Delgado-Calle J, Anderson J, Cregor MD, Hiasa M, Chirgwin JM, Carlesso N, et al. Bidirectional Notch Signaling and Osteocyte-Derived Factors in the Bone Marrow Microenvironment Promote Tumor Cell Proliferation and Bone Destruction in Multiple Myeloma. *Cancer Research*. 2016;76(5):1089-100.

93. Zanotti S, Smerdel-Ramoya A, Stadmeier L, Durant D, Radtke F, Canalis E. Notch inhibits osteoblast differentiation and causes osteopenia. *Endocrinology*. 2008;149(8):3890-9.

94. Sekine C, Koyanagi A, Koyama N, Hozumi K, Chiba S, Yagita H. Differential regulation of osteoclastogenesis by Notch2/Delta-like 1 and Notch1/Jagged1 axes. *Arthritis research & therapy*. 2012;14(2):R45.

95. Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith M, Maeda N, et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*. 2005;309(5740):1559-63.

96. Bhan A, Soleimani M, Mandal SS. Long noncoding RNA and cancer: a new paradigm. *Cancer research*. 2017;77(15):3965-81.

97. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics*. 2011;12(12):861-74.

98. Fang S, Zhang L, Guo J, Niu Y, Wu Y, Li H, et al. NONCODEV5: a comprehensive annotation database for long non-coding RNAs. *Nucleic acids research*. 2017;46(D1):D308-D14.

99. Niederer RO, Hass EP, Zappulla DC. Long Noncoding RNAs in the Yeast *S. cerevisiae*. *Advances in experimental medicine and biology*. 2017;1008:119-32.
100. Kim S, Jeong H, Kim EY, Kim JF, Lee SY, Yoon SH. Genomic and transcriptomic landscape of *Escherichia coli* BL21(DE3). *Nucleic Acids Res*. 2017;45(9):5285-93.
101. Wang P, Xu J, Wang Y, Cao X. An interferon-independent lncRNA promotes viral replication by modulating cellular metabolism. *Science*. 2017;358(6366):1051-5.
102. Necsulea A, Soumillon M, Warnefors M, Liechti A, Daish T, Zeller U, et al. The evolution of lncRNA repertoires and expression patterns in tetrapods. *Nature*. 2014;505(7485):635.
103. Pang KC, Frith MC, Mattick JS. Rapid evolution of noncoding RNAs: lack of conservation does not mean lack of function. *Trends in genetics*. 2006;22(1):1-5.
104. Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, Feldser D, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature*. 2009;458(7235):223.
105. Cerase A, Pintacuda G, Tattermusch A, Avner P. Xist localization and function: new insights from multiple levels. *Genome Biology*. 2015;16(1):166.
106. Panzitt K, Tschernatsch MM, Guelly C, Moustafa T, Stradner M, Strohmaier HM, et al. Characterization of HULC, a novel gene with striking up-regulation in hepatocellular carcinoma, as noncoding RNA. *Gastroenterology*. 2007;132(1):330-42.
107. Laurent GS, Wahlestedt C, Kapranov P. The Landscape of long noncoding RNA classification. *Trends in Genetics*. 2015;31(5):239-51.
108. Jarroux J, Morillon A, Pinskaya M. History, Discovery, and Classification of lncRNAs. *Advances in experimental medicine and biology*. 2017;1008:1-46.
109. Khalil AM, Guttman M, Huarte M, Garber M, Raj A, Morales DR, et al. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(28):11667-72.

110. Hezroni H, Koppstein D, Schwartz MG, Avrutin A, Bartel DP, Ulitsky I. Principles of long noncoding RNA evolution derived from direct comparison of transcriptomes in 17 species. *Cell reports*. 2015;11(7):1110-22.
111. Zhang Y, Zhang XO, Chen T, Xiang JF, Yin QF, Xing YH, et al. Circular intronic long noncoding RNAs. *Molecular cell*. 2013;51(6):792-806.
112. Pelechano V, Steinmetz LM. Gene regulation by antisense transcription. *Nature reviews Genetics*. 2013;14(12):880-93.
113. Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome research*. 2012;22(9):1775-89.
114. Zucchelli S, Fasolo F, Russo R, Cimatti L, Patrucco L, Takahashi H, et al. SINEUPs are modular antisense long non-coding RNAs that increase synthesis of target proteins in cells. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2015;9:174.
115. Orekhova AS, Rubtsov PM. Bidirectional promoters in the transcription of mammalian genomes. *Biochemistry Biokhimiia*. 2013;78(4):335-41.
116. Scruggs BS, Gilchrist DA, Nechaev S, Muse GW, Burkholder A, Fargo DC, et al. Bidirectional transcription arises from two distinct hubs of transcription factor binding and active chromatin. *Molecular cell*. 2015;58(6):1101-12.
117. Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Molecular cell*. 2011;43(6):904-14.
118. Tsai MC, Manor O, Wan Y, Mosammaparast N, Wang JK, Lan F, et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science*. 2010;329(5992):689-93.
119. Sun M, Nie F, Wang Y, Zhang Z, Hou J, He D, et al. LncRNA HOXA11-AS Promotes Proliferation and Invasion of Gastric Cancer by Scaffolding the Chromatin Modification Factors PRC2, LSD1, and DNMT1. *Cancer Res*. 2016;76(21):6299-310.
120. Sun TT, He J, Liang Q, Ren LL, Yan TT, Yu TC, et al. LncRNA GCInc1 Promotes Gastric Carcinogenesis and May Act as a Modular Scaffold of WDR5

and KAT2A Complexes to Specify the Histone Modification Pattern. *Cancer discovery*. 2016;6(7):784-801.

121. Collins K. Physiological assembly and activity of human telomerase complexes. *Mechanisms of ageing and development*. 2008;129(1-2):91-8.

122. Kay GF, Penny GD, Patel D, Ashworth A, Brockdorff N, Rastan S. Expression of Xist during mouse development suggests a role in the initiation of X chromosome inactivation. *Cell*. 1993;72(2):171-82.

123. Sado T, Hoki Y, Sasaki H. Tsix silences Xist through modification of chromatin structure. *Dev Cell*. 2005;9(1):159-65.

124. Huarte M, Guttman M, Feldser D, Garber M, Koziol MJ, Kenzelmann-Broz D, et al. A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell*. 2010;142(3):409-19.

125. Hung T, Wang Y, Lin MF, Koegel AK, Kotake Y, Grant GD, et al. Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters. *Nature genetics*. 2011;43(7):621.

126. Bonasio R, Tu S, Reinberg D. Molecular signals of epigenetic states. *Science*. 2010;330(6004):612-6.

127. Sentürk Cetin N, Kuo C-C, Ribarska T, Li R, Costa IG, Grummt I. Isolation and genome-wide characterization of cellular DNA:RNA triplex structures. *Nucleic Acids Research*. 2019;47(5):2306-21.

128. Zhao Z, Senturk N, Song C, Grummt I. lncRNA PAPAS tethered to the rDNA enhancer recruits hypophosphorylated CHD4/NuRD to repress rRNA synthesis at elevated temperatures. *Genes & development*. 2018;32(11-12):836-48.

129. Kino T, Hurt DE, Ichijo T, Nader N, Chrousos GP. Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Science signaling*. 2010;3(107):ra8.

130. An Y, Furber KL, Ji S. Pseudogenes regulate parental gene expression via ceRNA network. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2017;21(1):185-92.

131. Poliseno L, Salmena L, Zhang J, Carver B, Haveman WJ, Pandolfi PP. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature*. 2010;465(7301):1033-8.
132. Nobili L, Lionetti M, Neri A. Long non-coding RNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Oncotarget*. 2016;7(31):50666.
133. Casero D, Sandoval S, Seet CS, Scholes J, Zhu Y, Ha VL, et al. Long non-coding RNA profiling of human lymphoid progenitor cells reveals transcriptional divergence of B cell and T cell lineages. *Nature immunology*. 2015;16(12):1282.
134. Brazão TF, Johnson JS, Müller J, Heger A, Ponting CP, Tybulewicz VL. Long noncoding RNAs in B-cell development and activation. *Blood*. 2016;128(7):e10-e9.
135. Ranzani V, Rossetti G, Panzeri I, Arrigoni A, Bonnal RJ, Curti S, et al. The long intergenic noncoding RNA landscape of human lymphocytes highlights the regulation of T cell differentiation by linc-MAF-4. *Nature immunology*. 2015;16(3):318.
136. Petri A, Dybkær K, Bøgsted M, Thruø CA, Hagedorn PH, Schmitz A, et al. Long noncoding RNA expression during human B-cell development. *PloS one*. 2015;10(9):e0138236.
137. Tayari MM, Winkle M, Kortman G, Sietzema J, de Jong D, Terpstra M, et al. Long noncoding RNA expression profiling in normal B-cell subsets and Hodgkin lymphoma reveals hodgkin and reed-sternberg cell-specific long noncoding RNAs. *The American journal of pathology*. 2016;186(9):2462-72.
138. Nobili L, Ronchetti D, Agnelli L, Taiana E, Vinci C, Neri A. Long non-coding RNAs in multiple myeloma. *Genes*. 2018;9(2):69.
139. Butova R, Vychytilova-Faltejskova P, Souckova A, Sevcikova S, Hajek R. Long non-coding RNAs in multiple myeloma. *Non-coding RNA*. 2019;5(1):13.
140. Ji P, Diederichs S, Wang W, Boing S, Metzger R, Schneider PM, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 2003;22(39):8031-41.

141. Zhang X, Hamblin MH, Yin K-J. The long noncoding RNA Malat1: Its physiological and pathophysiological functions. *RNA Biology*. 2017;14(12):1705-14.
142. Cho S-F, Chang YC, Chang C-S, Lin S-F, Liu Y-C, Hsiao H-H, et al. MALAT1 long non-coding RNA is overexpressed in multiple myeloma and may serve as a marker to predict disease progression. *BMC cancer*. 2014;14(1):809.
143. Handa H, Kuroda Y, Kimura K, Masuda Y, Hattori H, Alkebsi L, et al. Long non-coding RNA MALAT 1 is an inducible stress response gene associated with extramedullary spread and poor prognosis of multiple myeloma. *British journal of haematology*. 2017;179(3):449-60.
144. Gao D, Lv Ae, Li HP, Han DH, Zhang YP. LncRNA MALAT-1 elevates HMGB1 to promote autophagy resulting in inhibition of tumor cell apoptosis in multiple myeloma. *Journal of cellular biochemistry*. 2017;118(10):3341-8.
145. Amodio N, Stamato MA, Juli G, Morelli E, Fulciniti M, Manzoni M, et al. Drugging the lncRNA MALAT1 via LNA gapmeR ASO inhibits gene expression of proteasome subunits and triggers anti-multiple myeloma activity. *Leukemia*. 2018;32(9):1948.
146. Benetatos L, Dasoula A, Hatzimichael E, Georgiou I, Syrrou M, Bourantas KL. Promoter hypermethylation of the MEG3 (DLK1/MEG3) imprinted gene in multiple myeloma. *Clinical lymphoma & myeloma*. 2008;8(3):171-5.
147. Shen X, Bai H, Zhu H, Yan Q, Yang Y, Yu W, et al. 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 : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2018;49(1):87-100.
148. Zhuang W, Ge X, Yang S, Huang M, Zhuang W, Chen P, et al. Upregulation of lncRNA MEG3 Promotes Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells From Multiple Myeloma Patients By Targeting BMP4 Transcription. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2015;33(6):1985-97.

149. Sedlarikova L, Gromesova B, Kubackzkova V, Radova L, Filipova J, Jarkovsky J, et al. Deregulated expression of long non-coding RNA UCA1 in multiple myeloma. *European journal of haematology*. 2017;99(3):223-33.
150. Yang Y, Chen L. Downregulation of lncRNA UCA1 facilitates apoptosis and reduces proliferation in multiple myeloma via regulation of the miR-1271-5p/HGF axis. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA*. 2019;82(9):699-709.
151. Taiana E, Ronchetti D, Favasuli V, Todoerti K, Manzoni M, Amodio N, et al. Long non-coding RNA NEAT1 shows high expression unrelated to molecular features and clinical outcome in multiple myeloma. *Haematologica*. 2019;104(2):e72-e6.
152. Xu H, Li J, Zhou ZG. NEAT1 promotes cell proliferation in multiple myeloma by activating PI3K/AKT pathway. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2018;22(19):6403-11.
153. Graham LD, Pedersen SK, Brown GS, Ho T, Kassir Z, Moynihan AT, et al. Colorectal neoplasia differentially expressed (CRNDE), a novel gene with elevated expression in colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Genes & cancer*. 2011;2(8):829-40.
154. Zhang J, Yin M, Peng G, Zhao Y. CRNDE: An important oncogenic long non-coding RNA in human cancers. *Cell proliferation*. 2018;51(3):e12440.
155. Meng YB, He X, Huang YF, Wu QN, Zhou YC, Hao DJ. Long Noncoding RNA CRNDE Promotes Multiple Myeloma Cell Growth by Suppressing miR-451. *Oncology research*. 2017;25(7):1207-14.
156. Yang N, Chen J, Zhang H, Wang X, Yao H, Peng Y, et al. LncRNA OIP5-AS1 loss-induced microRNA-410 accumulation regulates cell proliferation and apoptosis by targeting KLF10 via activating PTEN/PI3K/AKT pathway in multiple myeloma. *Cell death & disease*. 2017;8(8):e2975.
157. Chen L, Hu N, Wang C, Zhao H, Gu Y. Long non-coding RNA CCAT1 promotes multiple myeloma progression by acting as a molecular sponge of miR-181a-5p to modulate HOXA1 expression. *Cell Cycle*. 2018;17(3):319-29.

158. Li Q-y, Chen L, Hu N, Zhao H. Long non-coding RNA FEZF1-AS1 promotes cell growth in multiple myeloma via miR-610/Akt3 axis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;103:1727-32.
159. Xiao G, Li Y, Wang Y, Zhao B, Zou Z, Hou S, et al. LncRNA PRAL is closely related to clinical prognosis of multiple myeloma and the bortezomib sensitivity. *Experimental cell research*. 2018;370(2):254-63.
160. Ronchetti D, Agnelli L, Taiana E, Galletti S, Manzoni M, Todoerti K, et al. Distinct lncRNA transcriptional fingerprints characterize progressive stages of multiple myeloma. *Oncotarget*. 2016;7(12):14814.
161. Zhou M, Zhao H, Wang Z, Cheng L, Yang L, Shi H, et al. Identification and validation of potential prognostic lncRNA biomarkers for predicting survival in patients with multiple myeloma. *Journal of experimental & clinical cancer research*. 2015;34(1):102.
162. Isin M, Ozgur E, Cetin G, Erten N, Aktan M, Gezer U, et al. Investigation of circulating lncRNAs in B-cell neoplasms. *Clinica chimica acta*. 2014;431:255-9.
163. Sun Y, Pan J, Zhang N, Wei W, Yu S, Ai L. Knockdown of long non-coding RNA H19 inhibits multiple myeloma cell growth via NF-kappaB pathway. *Scientific reports*. 2017;7(1):18079.
164. Pan Y, Chen H, Shen X, Wang X, Ju S, Lu M, et al. Serum level of long noncoding RNA H19 as a diagnostic biomarker of multiple myeloma. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2018;480:199-205.
165. Sedlarikova L, Bollova B, Radova L, Brozova L, Jarkovsky J, Almasi M, et al. Circulating exosomal long noncoding RNA PRINS-First findings in monoclonal gammopathies. *Hematological oncology*. 2018;36(5):786-91.
166. Cunningham F, Achuthan P, Akanni W, Allen J, Amode MR, Armean IM, et al. Ensembl 2019. *Nucleic acids research*. 2018;47(D1):D745-D51.
167. Gene [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information 2004 [2020/01/18]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>.
168. Zhao J, Xu J, Shang AQ, Zhang R. A Six-LncRNA Expression Signature Associated with Prognosis of Colorectal Cancer Patients. *Cellular physiology*

and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology. 2018;50(5):1882-90.

169. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic acids research. 2001;29(9):e45-e.

