

NEZAHAT ECE BIBEROĞLU

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2018

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**AKUT MİYELOİD LÖSEMİ HASTALARINDA
KATLANMAMIŞ YA DA YANLIŞ KATLANMIŞ PROTEİN
CEVABININ XBP-1 GENİ ÜZERİNDEN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

NEZAHAT ECE BİBEROĞLU

**DANIŞMAN
DOÇ.DR. NESLİHAN ABACI**

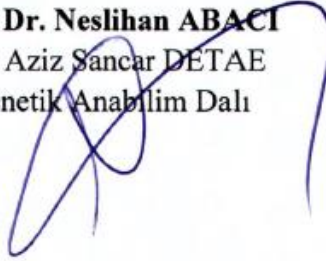
**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2018

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Yüksek Lisans öğrencisi Nezahat Ece BİBEROĞLU tarafından Doç. Dr. Neslihan ABACI'nin danışmanlığında hazırlanan “**Akut Miyeloid Lösemi Hastalarında Katlanmamış ya da Katlanmış Protein Cevabının XBP-1 Geni Üzerinden Etkisinin Araştırılması**” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 10.05.2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Neslihan ABACI
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı



Doç. Dr. Sema SIRMA EKMEKÇİ
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı



Dr. Öğr. Üyesi C. Gökhan EKMEKÇİ
Acıbadem Üniversitesi
Sağlık Hizmetleri Yüksek Okulu



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

NEZAHAT ECE BİBEROĞLU



İTHAF

AİLEME, ARKADAŞLARIMA VE SEVGİLİ YAĞIZ'A

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim döneminde ve tez çalışmamda sağladığı imkanlar, gösterdiği ilgi, alaka ve sabır için, bilgi ve deneyimleri ile katkısını esirgemeyerek bana her zaman örnek olan değerli hocam, tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Neslihan ABACI'ya,

Her zaman desteğini gördüğüm, bilgi ve tecrübesinden faydalandığım değerli hocam Sayın Doç. Dr. Sema Sırma Ekmekçi'ye,

Stajyerlik dönemimden başlayarak devam eden yüksek lisansıma kadar her süreçte bana destek olan ve deneyimlerini aktaran sevgili Dr. Zeliha EMRENCE'ye ve Uzman Biyolog Melda Sarıman'a,

Tez çalışmamın gerçekleşmesinde yardımlarını esirgemeyen, Dr. Aris Çakiris'e ve Dr. Ferda Paçal'a, Biyomühendis Burcu Salman'a, Moleküler Biyolog Atilla Mehmet Güler'e ve sevgili stajyerlerimiz Elif Kaplan, Ülkü Hüma Altındağ, Damla Demirkaya, Sedat Demiriz'e,

Tez sürecimde bana büyük emeği geçen sevgili arkadaşım Burcu Karakuzu'ya,

Bütün eğitim sürecinde ve hayatım boyunca hep yanımda olan sevgili arkadaşlarım Fulya Kabaoğlu'na, Çiğdem Ekşi Rüstemov'a, Pelin Ekşi'ye ve Fatoş Dönmez'e,

Eğitimimde bana her türlü desteği veren, bana inanan ve beni bu günlere getiren değerli aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. AKUT MİYELOİD LÖSEMİ.....	3
2.1.1. Hematopoez	3
2.1.2. Lösemilerin tanımı	3
2.1.3. Lösemilerin Tarihçesi	3
2.1.4. Akut Myeloid Lösemi	4
2.1.4.1. Epidemiyoloji.....	4
2.1.4.2. Sınıflandırma.....	5
2.1.4.3. Akut Myeloid Lösemi Hücrelerinde Sık Kullanılan İmmünolojik Belirteçler	7
2.1.4.4. Etiyoloji.....	8
2.1.4.5. AML Patogeneğinde Rol Oynayan Genetik Değişimler	9
2.1.4.6. Klinik.....	9
2.1.4.7. Tedavi.....	9
2.2. Endoplazmik Retikulum ve Görevleri	10
2.2.1. Protein Katlanmasında Görev Alan Süreçler/Mekanizmalar.....	11
2.2.1.1. Disülfid Bağ Oluşumu	11
2.2.1.2. Sinyal Peptidi Kesimi.....	11
2.2.1.3. Glikolizasyon	12

2.3. ER Stres	13
2.3.1. ER Strese Neden Olan Durumlar	13
2.3.2. ER Strese Neden Olan Kimyasallar	14
2.3.3. ER Streste Rol Oynayan Şaperonlar ve Mekanizmalar	15
2.3.3.1. Bağlanma Proteini (BiP)/GRP78	15
2.3.3.2. Kalneksin/Kalretikulin Döngüsü.....	16
2.3.3.3. ERAD Mekanizması	17
2.3.3.3.1. Katlanmamış/Yanlış katlanmış Proteinlerin Tanınması.....	18
2.3.3.3.3. Ubikitinasyon	19
2.3.4. ER Stres Cevabında Yapılanlar.....	20
2.4. Katlanmamış Protein Cevabı	20
2.4.1. PERK Yolağı.....	22
2.4.2. ATF6 Yolağı	23
2.4.3. IRE1 Yolağı	24
2.4.3.1. XBP1	26
2.4.4. XBP1 Yolağı ve Kanser	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1. Gereç	36
3.1.1. Kullanılan Hasta Örnekleri	36
3.1.2. Kullanılan Kontrol Örnekleri	36
3.1.3. Kullanılan Kitler	36
3.1.4. Kullanılan Cihazlar	36
3.2. Yöntem.....	37
3.2.1. Kalitatif PZR.....	37
3.2.1.1. sold' den RNA Elde Edilmesi	37
3.2.1.2. Hasta örneklerinin RNA'larından cDNA İzolasyonu	38
3.2.2. Kantitatif Eş Zamanlı PZR (qRT-PZR)	39
3.3. İstatiksel Analiz	41
4. BULGULAR.....	43
5. TARTIŞMA	54
KAYNAKLAR	60
FORMLAR	67
ETİK KURUL KARARI	68

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	69
ÖZGEÇMİŞ	70



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: AML’ de FAB sınıflandırılması (6, 18)	5
Tablo 2-2: AML’ nin WHO sınıflandırması (16, 19)	6
Tablo 2-3: Miyeloid hücreler için sık kullanılan immünolojik belirteçler (6, 20).....	7
Tablo 2-4: AML ile ilişkili risk faktörleri (21)	8
Tablo 3-1: XBP1 genine ait primerler	39
Tablo 3-2: XBP1, HLAB, BiP ve 18SrRNA’ya spesifik primerler	40
Tablo 4-1: Cinsiyete göre AML olgularının dağılımı.....	43
Tablo 4-2: Çocukluk çağı ve yetişkin AML olgularının cinsiyete göre dağılımı	43
Tablo 4-3: Olguların HLAB, XBP1 ve BiP ekspresyonları.....	44
Tablo 4-4: Çocukluk çağı ve yetişkin AML olgularının HLAB, BiP ve XBP1 ekspresyon değerlerinin karşılaştırılması.....	44
Tablo 4-5: HLA-B, BiP, XBP1 ekspresyon değerlerinin cinsiyet ile karşılaştırılması ..	45
Tablo 4-6: HLA-B, BiP ve XBP1 ekspresyonlarının, lökosit sayısı ve yaş ile karşılaştırması	46
Tablo 4-7: AML olgularının t(15;17), t(8;21), inv(16) ve FLT3 sıklıkları.....	46
Tablo 4-8: AML olgularının FAB grupları.....	47
Tablo 4-9: HLAB ekspresyonunun t(15;17), t(8;21) ,inv(16) ve FLT3 pozitif ve negatif olgular arasında karşılaştırması	47
Tablo 4-10: BiP ekspresyonunun t(15;17), t(8;21), inv(16) ve FLT3 pozitif ve negatif olgular arasında karşılaştırması	48
Tablo 4-11: XBP1 ekspresyonunun t(15;17), t(8;21), inv(16) ve FLT3 pozitif ve negatif olgular arasında karşılaştırması	49
Tablo 4-12: Kontrol ve hasta grubu arasında HLA-B, BiP ve XBP1 ekspresyon değerlerinin karşılaştırması.....	49
Tablo 4-13: XBP1s varyantı bulunan olgularla XBP1s varyantı bulunmayan olguların yaş, cinsiyet, lökosit sayısı ve blast oranı açısından karşılaştırılması	50
Tablo 4-14: XBP1s varyantı bulunan olgularla XBP1s bulunmayan olguların karşılaştırılması.....	51
Tablo 4-15: XBP1 varyantının bulunduğu olguların sınıflandırılması.....	51

Tablo 4-16: Yeni tanıli olgularla tedavi sonra gelişlerinin HLAB, BİP ve XBP1 ekspresyonlarının karşılaştırılması	52
Tablo 4-17: Yeni tanıli olgularla tedavi sonra gelişlerinin HLA-B, BiP ve XBP1 ekspresyonlarının karşılaştırılması	52
Tablo 4-18: AML olgularının tedavi sonrası 2.gelişlerinde XBP1s varyantının durumu	53
Tablo 4-19: MPO(+) AML olguları	53



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Kan hücrelerinin farklılaşması (2)	3
Şekil 2-2: Endoplazmik retikulum (30)	10
Şekil 2-3: Sinyal peptidi kesimi (28)	12
Şekil 2-4: BiP'in bölgeleri	15
Şekil 2-5: Kalneksin/Kalretikulin döngüsü.....	16
Şekil 2-6: ERAD Mekanizması (40).....	17
Şekil 2-7: Katlanamayan/yanlış katlanmış proteinlerin degradasyon için sitoplazmaya taşınması (42).....	19
Şekil 2-8: Katlanmamış protein cevabı (UPR) yolları	21
Şekil 2-10: PERK (53).....	22
Şekil 2-11: ATF6 α (53)	23
Şekil 2-12: IRE1 α (53).....	24
Şekil 2-13: XBP1s ve XBP1u formlarının şematik gösterimi (53)	27
Şekil 2-14: IRE1 α /XBP1 yolağı	28
Şekil 2-15: IRE1 α -XBP1 yolağının rol oynadığı durumlar	29
Şekil 2-16: XBP1'in endotel hücre proliferasyonundaki rolü	31
Şekil 3-1: 15 AML olgusunda XBP1s ve XBP1u varyantları	39
Şekil 3-2: Örneklere ait amplifikasyon ve standart eğrileri	41

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ABL	Abelson Murine Leukemia viral oncogene homolog
ADP:	Adenozin difosfat
Akt:	Serine-threonine protein kinase
ALL:	Akut Lenfoblastik Lösemi
AML:	Akut Miyeloid Lösemi
APL:	Akut Premiyelositik Lösemi
ASXL1:	Additional Sex Combs Like 1
ATF4:	Activating Transcription Factor 4
ATF6:	Activating transcription factor 6
Atg9A:	Autophagy Related 9A
ATP:	Adenozin trifosfat
Bç:	Baz çifti
BCR:	Breakpoint Cluster Region
BDNF:	Brain-derived neurotrophic factor
BiP:	Binding protein/GRP78
bZIP:	Basic leucine zipper
C/EBP α :	CCAAT/enhancer binding protein α
CASP2:	Kaspaz 2
CD:	Cluster of differentiation
CEBPA:	CCAAT/Enhancer-Binding Protein Alpha
CHOP:	CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein
c-KIT:	Tyrosine-protein kinase Kit or CD117
Cnx:	Kalneksin
CRE:	cAMP response element
CREB/ATF:	cAMP responsive element binding protein/activating transcription factor
Crt:	Kalretikulin
CRY:	Cryptochrome Circadian Regulator
DNMT3A:	DNA-methyltransferase 3A
DTT:	Ditiotreitol

EDEM:	ER-degradation-enhancing- α -mannidose-like protein
EH:	Endotel hücre
eIF2 α :	Ökaryot başlama faktörü 2 alfa
ER Man I:	ER mannosidaz 1
ER:	Endoplazmik Retikulum
ERAD:	ER-associated degradation
ERdj4:	Endoplasmic Reticulum DnaJ Homolog 4
ERN:	Endoplasmic Reticulum To Nucleus Signaling
FAB:	French-American-British
FLT3:	FMS-like tyrosine kinase 3
GADD34:	Growth arrest and DNA damage-inducible protein 34
GCN2:	General control nonderepressible 2
GDP	Guanosine diphosphate
GRP94	Glucose-Regulated Protein 94
GSK:	Glycogen synthase kinase 3
HEDJ9:	Human DnaJ Protein 9
HLA:	Human leucocyte antigen
HR:	Hidrofobik bölge
HR1:	Heme-Regulated Inhibitor
HRD1:	HMG-CoA Reductase Degradation 1 Homolog
HSCT:	Hematopoetik kök hücre nakli
HSP:	Heat Shock Protein
IDH:	Isocitrate dehydrogenase
IFN β :	interferon- β
IL6	İnterlökin 6
IRE1 α :	İnositol gerektiren enzim 1 alfa
Mab:	Monoklonal Antikor
MAFA:	Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue A
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MHC:	Major histocompatibility complex
MLL:	Mixed Lineage Leukemia

MM:	Multipl miyelom
MRH:	Mannoz reseptör homoloji
NPL4:	Nuclear protein localization protein 4
NPM1:	Nucleophosmin 1
OS9:	Osteosarkom 9
PDI:	Protein disülfid izomeraz
PDX1:	Pancreatic And Duodenal Homeobox 1
PERK:	Protein kinaz R-benzeri endoplazmik retikulum kinaz
Ph:	Philadelphia kromozomu
PKR:	dsRNA'ya bağlı protein kinaz
PML:	Promiyelocytic Leukemia
PP1:	Protein fosfat 1
PZR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
qRT-PZR:	Kantitatif Eş zamanlı Polimeraz zincir reaksiyonu
RARA:	Retinoik Asit Reseptör Alfa
RCTB:	tRNA-splicing ligase from bacteria
RIDD:	IRE1-dependent decay
RUNX1:	Runt-related transcription factor 1
S1P:	Site-1 protease
S2P:	Site-2 protease
SEL1L:	Lin12 benzeri protein supresör 1
SRP:	Sinyal tanıma partikülü
TAP1:	Transporter of antigenic peptides-1
TET2:	Ten-Eleven Translocation 2
TLR:	Toll-benzeri reseptörler
TNBC:	Triple-negative breast cancer
TNF:	Tümör nekroz faktörü
TP53:	Tumor Protein 53
UDP:	Uridine diphosphate
UFD1:	Ubiquitin fusion degradation 1
UGGT:	UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase
UPR:	Unfolded protein response

UPS:	Ubiquitin–proteasome system
VCP:	Valosin-containing protein
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO:	World Health Organization
XBP1:	X-Box Protein 1
XBP1s:	XBP1-splicing
XBP1u:	XBP1-unsplicing
XTP3B:	XTP3-transactivated gene B protein



ÖZET

Biberoğlu, N.E. (2018). Akut Miyeloid Lösemi hastalarında katlanmamış ya da yanlış katlanmış protein cevabının XBP-1 geni üzerinden etkisinin araştırılması. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Akut Miyeloid lösemi (AML), hematopoetik öncül hücrelerin erken bir aşamada gelişimini durdurarak kontrolsüz ve klonal çoğalmalarına neden olan malign bir hastalıktır. AML erişkinlerde en sık rastlanan akut lösemi olup, bu gruptaki vakaların %80'ini ve ayrıca çocukluk çağı lösemilerinin de %15-20'sini oluşturur. Kanser gelişiminin tümör hücrelerinin neden olduğu hipoksi, besin yetersizliği ve pH değişiklikleri gibi bir dizi sitotoksik koşul ile ilişkisi, hücrenin bu koşullarla baş etmesine yardımcı olan endoplazmik retikulum (ER) stres yanıtını tetikler. Hücre, ER stresin üstesinden gelebilmek ve normal fonksiyonlarına geri dönebilmek için katlanmamış protein cevabı (unfolded protein response-UPR) sinyal yollarını devreye sokar. UPR sinyal yolağında önemli rolü olan XBP1s (*X-Box Protein 1-splicing*), ER şaperonları ve ER-ilişkili degradasyon mekanizmasında (ERAD) görev alan genleri uyararak hücrenin ER stresten kurtulmasını sağlar. Multipl miyelom, meme kanseri gibi birçok kanserde XBP1s ekspresyon seviyelerinde görülen artış, bu cevabın kanser progresyonunda önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir. AML'nin alt tipi olan akut promiyelositik lösemi (APL) hücrelerinde, *PML-RARA* füzyon proteininin UPR'yi aktif ettiği bulunmuş ve ayrıca B-Akut lenfoblastik lösemide (B-ALL) de XBP1s ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Bu bilgiler, UPR sinyal yolağında görev alan XBP1 geninin AML prognozuyla da ilişkisinin olabileceğini gösterdiğinden bu tez çalışmasında, AML olgularında XBP1u (*XBP1-unsplicing*) ve XBP1s etkisi araştırıldı. AML' de sık görülen t(8;21), t(15;17) ve inv(16) sitogenetik değişimlerine ve FLT3 mutasyonuna sahip olan ve bu değişimlere sahip olmayan toplam 100 AML olgusuyla yapılan çalışmada, 15 AML olgusunda XBP1s varyantı bulundu. XBP1s varyantının bulunması, AML'de UPR sinyal yollarının aktif olduğunu ve XBP1s'in anti-kanser terapi için yeni bir hedef olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Akut miyeloid lösemi, ER stres, UPR, XBP1, XBP1 ekspresyon

ABSTRACT

Biberoğlu, N.E. (2018). Investigation of the effect of the unfolded or misfolded protein response on the XBP1 gene in patients with acute myeloid leukemia. İstanbul University, Institute of Health Science, Genetics. Master Thesis. İstanbul.

Acute myeloid leukemia (AML) is a malignant disease that causes uncontrolled and clonal proliferation by stopping the development of hematopoietic precursors at an early stage. AML is the most common acute leukemia in adults, accounting for 80% of cases in this group and 15-20% of childhood leukemia. The relationship of cancer development to a number of cytotoxic conditions, such as hypoxia, nutritional deficiency and pH changes caused by tumor cells, triggers an ER stress response that helps the cell cope with these conditions. The cell activates unfolded protein response (UPR) signaling pathways for get over ER stress and return to normal functions. The XBP1s (X-Box Protein 1-splicing), involved in the UPR signal pathway, allows survival of the ER stress of the cell by stimulating genes included in ER chaperones and ER-related degradation mechanism (ERAD). The XBP1s expression levels play role in many cancers such as acute promyelocytic leukemia (APL) cells activates the UPR and the expression of XBP1s in B-Acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) is increased. In this thesis study, the effects of XBP1u (XBP1-unsplicing) and XBP1s in AML cases were investigated, because the XBP1s gene may be related to the AML prognosis. A total of 100 AML cases with present and absent FLT3 mutations and t(8;21), t(15;17) and inv(16) cytogenetic changes were studied and 15 variants of XBP1s were found in AML cases. The presence of the XBP1s variant demonstrates that UPR signaling pathways are active in AML and that XBP1s may be a new target for anti-cancer therapy.

Key Words: Acute Myeloid Leukemia, ER stress, UPR, XBP1 gene, XBP1 expression

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akut Miyeloid lösemi (AML), miyeloid progenitörlerinin malign transformasyonu sonucu gelişerek ortaya çıkan ve bu hücrelerin (blast) kemik iliğinde, kanda ve diğer dokularda birikmesiyle karakterize edilen hematopoetik bir hastalıktır. AML'nin erişkinlerde görülme sıklığı 4/100.000 olmakla birlikte, erkeklerde kadınlardan daha fazla görülmektedir ve yaşla birlikte insidansı da artmaktadır.

AML, genetik olarak çok heterojen bir hastalıktır. AML'nin oluşumunda en sık gözlenen genetik değişimler; t(8;21), t(15;17) ve inv(16) kromozom anomalileri ve *NPM1*, *DNMT3A*, *FLT3*, *IDH*, *TET2*, *RUNX1*, *CEBPA*, *ASXL1*, *MLL*, *TP53*, *c-KIT* genlerinde meydana gelen mutasyonlardır.

Malign hücreler, sürekli büyümeyi desteklemek ve sağkalım için metabolizmalarını yeniden canlandırma yeteneğine sahiptir. Kanser hücrelerinin onkojene bağlı hızlı proliferasyonu, membran ve sekretuar proteinlerinin artan üretimini gerektirdiği için hücresel protein katlanma mekanizmasına olan talep artar. Dahası, tümör mikroçevresinde yetersiz vaskülarizasyona bağlı olarak besin gereksiniminde de artış olur. Tümör büyüdükçe kanser hücrelerinde meydana gelen besin yetersizliği, hipoksi ve oksidatif stres gibi durumlar ER stresi indükler. ER stresten kurtulmak için kanser hücreleri; protein kinaz R-benzeri endoplazmik retikulum kinaz (PERK), transkripsiyon faktörü 6 aktive edici protein (ATF6) ve inositol gerektiren enzim 1 alfa (IRE1 α) adı verilen 3 ana koldan oluşan UPR sinyal yollarını uyarır. IRE1 α , hücre ER strese girdiğinde XBP1'i keserek hayli aktif bir transkripsiyon faktörü olan XBP1s'in oluşmasını sağlar. XBP1s; protein katlanmasında görev alan birçok şaperonun, protein kalite kontrolünde rolü olan genlerin ve ERAD mekanizması bileşenlerinin transkripsiyonlarını indükleyerek hücrenin ER stresle baş etmesine yardımcı olur.

ER şaperon proteini BiP (Binding protein/GRP78), kanser hücrelerinin en aktif bileşenlerinden biridir ve farklı türdeki birçok kanserde aşırı eksprese edildiği gözlemlenmiştir. ER streste BiP, katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlere bağlanarak doğru şekilde katlanmalarına yardımcı olur.

Ayrıca hücre ER streste değilken BiP, ER lümende bulunan PERK, ATF6 ve IRE1'e bağlı olması bu yolları inaktif şekilde tutar. Hücre ER strese girdiğinde BiP bu yollardan ayrılarak UPR'yi aktive eder.

Meme kanseri, hepato hücreli karsinom, pankreatik adenokarsinom, glioblastom, multipl miyelom gibi birçok insan kanserinde XBP1s seviyelerinde artış görülmüştür. Yapılan çalışmalarda, B-ALL alt tiplerinde BiP ve XBP1s ekspresyon seviyelerinin yüksek olduğu görülmüş, bu yüksek ekspresyon seviyeleri de kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca AML'nin alt tipi olan APL hücrelerinde, *PML-RARA* füzyon proteininin UPR bileşenlerini aktif ettiği bulunmuştur.

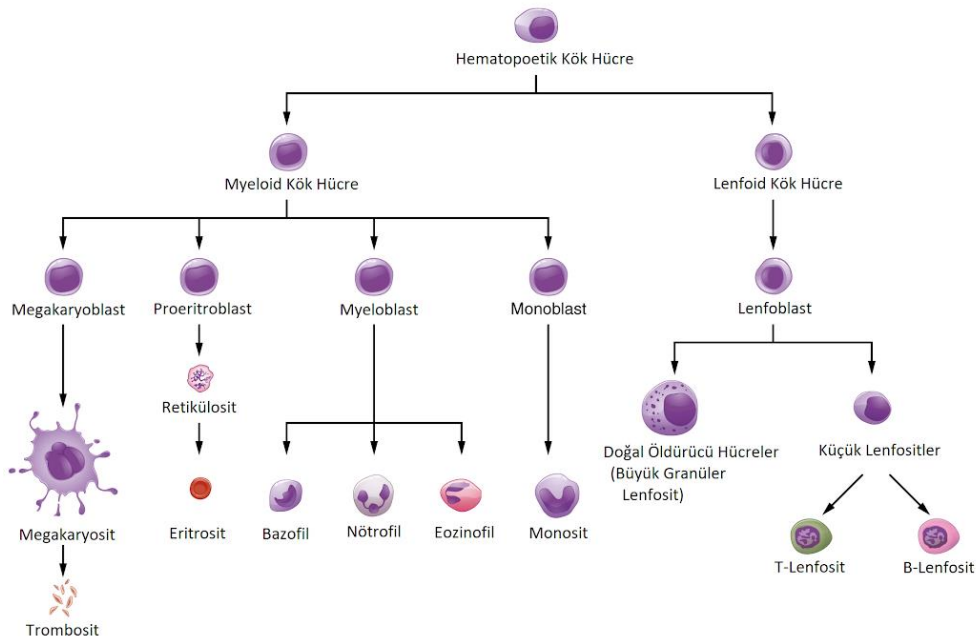
Bu bilgiler ışığında bu tezin amacı; AML hastalarında, UPR sinyal yolağında etkin olan XBP1u ve XBP1s'in etkisinin araştırılmasıdır. Türkiye'de daha önce AML'de, UPR sinyal yolağında görev alan XBP1 geninin çalışması yapılmamıştır. Bundan dolayı bu tez çalışmasında, öncelikle kalitatif PZR yöntemiyle AML olgularında XBP1s ve XBP1u varyantlarının olup olmadığına bakmayı hedefledik. Sonrasında ise AML'de sık görülen t(8; 21), t(15;17) ve inv(16) sitogenetik değişimlere ve FLT3 mutasyonuna sahip olan 38 AML olgusu ve bu değişimlere sahip olmayan 62 AML olgusunda HLA-B, BiP ve XBP1 ekspresyon düzeylerini kantitatif eş zamanlı PZR ile analiz etmeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.AKUT MİYELOİD LÖSEMİ

2.1.1.Hematopoez

Hematopoez, pluripotent öncü hücrelerin olgun kan hücre soylarına farklılaşma sürecidir ve embriyonik hayat boyunca birçok organda gerçekleşirken, yetişkinlerde çoğunlukla kemik iliğinde olur (Şekil 2-1) (1).



Şekil 2-1: Kan hücrelerinin farklılaşması (2)

2.1.2.Lösemilerin tanımı

Lösemiler, hematopoezin belirli bir aşamasındaki hücrelerin malign dönüşümü sonucu meydana gelen heterojen neoplastik hastalıklardır (3). Lösemiler en genel haliyle, etkilenen öncül hücre türüne bağlı olarak lenfoid veya miyeloid, hematopoezdeki kan hücresinin olgunlaşma aşamasına ve hastalığın başlama süresine göre de akut veya kronik olarak sınıflandırılır (3, 4).

2.1.3.Lösemilerin Tarihçesi

Lösemili bir hastaya ait ilk çalışma 1827’de ortaya çıkmıştır. Robert Hooke ve Anton van Leeuwenhoeck tarafından keşfedilen (1665-1673) mikroskopla kan hücrelerinin incelenmesi mümkün olmuştur. Kırmızı hücreleri ve beyaz hücreleri ilk

tanımlayanlar, Jan Swammerdam (1668) ve Joseph Lieutaud (1749)'dır. 1777'de ise William Hewson, lenfosit ve lenfatik sistemi açıklamıştır.

1845'te, Rudolf Virchow, John Hughes Bennett ve David Craigie tarafından yayınlanan üç bağımsız çalışmada şimdi lösemi olarak adlandırılan hastalık grubunun beyaz kan hücreleriyle bağlantılı olduğu gösterilmiştir (5). 1847 yılında Alman patolog Rudolph Virchow, Yunanca lökos (beyaz) ve aima (kan) kelimelerini birleştirerek hastalığın adını lösemi koymuştur (5, 6). 1850'de Henry Fuller, yaşayan bir hastadan alınan kanın mikroskopik incelemesi ile lösemiye teşhis eden ilk kişi olmuştur. 1879 yılında Paul Ehrlich, boya tekniklerini kullanarak lökositlerin granüllerine göre ayrılmasını gerçekleştirmiştir. 1889 yılında, klinik çevrelerde ilk "akut lösemi" terimini Ebstein kullanmıştır. Miyeloblast ve miyelosit tanımı ise ilk olarak 1900 yılında İsviçreli hematolog Otto Naegeli tarafından yapılmıştır (3, 7, 8).

2.1.4.Akut Myeloid Lösemi

Akut miyeloid lösemi (AML), öncü hematopoetik hücrelerin kontrollü olmayan klonal çoğalmasıyla ortaya çıkan günümüzde hala tam olarak etyolojisi aydınlatılmamış olmakla birlikte birçok genetik ve çevresel faktörün etkili olduğu malign bir hastalıktır (9, 10, 11, 12). AML, olgunlaşmamış myeloid progenitör hücrelerinin (blast) neoplastik transformasyonu sonucu kemik iliğinde, kanda ve diğer dokularda birikmesiyle karakterizedir (13).

2.1.4.1.Epidemiyoloji

Akut miyeloid lösemi (AML), erişkinlerde en sık rastlanan akut lösemi olup, bu gruptaki vakaların yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır. *National Cancer Institute*'ün 2010-2014 datasına göre; yeni akut miyeloid lösemi vakalarının sayısı, her 100.000 erkek ve kadın için yılda 4.2 iken, ölümlerin sayısı her yıl 100.000 erkek ve kadın için 2.8 olarak rapor edilmiştir (14, 15). Amerika Birleşik Devletlerinde 2015 yılında, yaklaşık 20.830 yeni vaka tespit edilmiş ve 10.000'den fazla hasta bu hastalıktan hayatını kaybetmiştir (16). AML' nin görülme sıklığı Türkiye'de 2.7/100.000 olarak bildirilmiştir (17). Akut miyeloid löseminin insidansı yaşla birlikte artar. Ortalama tanı yaşı 65 ve üstü olarak belirtilmiştir fakat yenidoğan dönemindeki sıklığı da fazladır (11, 16).

2.1.4.2.Sınıflandırma

2.1.4.2.1.FAB Sınıflaması

Akut myeloid lösemilerin en çok kullanılan sınıflandırma, 1976'da oluşturulan morfoloji ve sitokimya temelli French-American-British (FAB) sınıflandırmasıdır. AML' de FAB sınıflandırması Tablo 2-1'de gösterilmiştir (6, 18).

Tablo 2-1: AML' de FAB sınıflandırılması (6, 18)

Alt tip	Açıklama
M0	Minimal farklılaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi
M1	Olgunlaşma göstermeyen akut miyeloblastik lösemi
M2	Granülositik olgunlaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi
M3	Akut Promiyelositer lösemi
M3V	Akut varyant promiyelositer lösemi(mikrogranüler)
M4	Akut Miyelomonositer lösemi
M4E _o	Akut eozinofilik miyelomonositer lösemi
M5a	Akut Monoblastik lösemi
M5b	Akut Monositer lösemi
M6	Akut Eritroid lösemi
M7	Akut Megakaryoblastik lösemi

2.1.4.2.2.WHO Sınıflaması

2001'de, AML'nin tanı ve tedavisinde yapılan ilerlemeleri bütünleştirme çabasının bir parçası olarak, Dünya Sağlık Örgütü (*World Health Organization, WHO*), immünofenotipleme, morfoloji, sitogenetik ve moleküler biyolojik özellikleri kullanarak yeni bir sınıflandırma sistemi oluşturdu ve bu sistem 2008 yılında tekrar düzenlendi. Son olarak 2016 yılında daha yeni bir revize edilmiş versiyon yayınlandı, WHO'nun AML sınıflaması, altı majör hastalığın tanımlanması için son baskıdan bu yana ortaya çıkan yeni klinik, prognostik, morfolojik, immünofenotipik ve genetik veriler bir araya getirilerek oluşturuldu (16, 19). AML'nin WHO sınıflaması Tablo 2-2'de gösterilmiştir.

Tablo 2-2: AML' nin WHO sınıflandırması (16, 19)**Akut Miyeloid Lösemi ve İlişkili Neoplaziler****1. Tekrarlayan Genetik Anomalilerle Seyreden AML**

- ✓ t(8;21)(q22;q22.1); (RUNX1-RUNX1T1) ile AML
- ✓ inv(16)(p13.1q22) veya t(16;16)(p13.1;q22); (CBFβ/MYH11) ile AML
- ✓ PML-RARA ile AML
- ✓ t(9;11)(p21.3;q23.3); (MLLT3-KMT2A) ile AML
- ✓ t(6;9)(p23;q34.1); (DEK-NUP214) ile AML
- ✓ inv(3)(q21.3q26.2) veya t(3;3)(q21.3;q26.2); (GATA2, MECOM) ile AML
- ✓ Megakaryoblastik t(1;22)(p13.3;q13.3); (RBM15-MKL1) ile AML
- ✓ Tam geçerliliği olmayan durum: BCR-ABL1 ile AML
- ✓ NPM1 mutasyonu saptanan AML
- ✓ CEBPA biallellik mutasyonu saptanan AML
- ✓ FLT3 mutasyonu saptanan AML
- ✓ Tam geçerliliği olmayan durum: RUNX1 mutasyonu saptanan AML

2. Miyelodisplazi-ilişkili Değişikliklerle Seyreden AML**3. Tedavi-ilişkili Miyeloid Neoplaziler****4. Tanımlanan Gruplara Girmeyen AML**

- ✓ Minimal farklılaşma gösteren AML
- ✓ Olgunlaşma Göstermeyen AML
- ✓ Akut miyelomonositik lösemi
- ✓ Akut monoblastik ve monositer lösemi
- ✓ Akut eritroid lösemi
- ✓ Akut megakaryoblastik lösemi
- ✓ Akut bazofilik lösemi
- ✓ Akut miyelofibrozis ile panmiyeloiz lösemi

5. Miyeloid Lösemi**6. Down Sendromuyla İlişkili Miyeloid Proliferasyonlar**

- ✓ Geçici anormal miyelopoezis (TAM)
- ✓ Down Sendromuyla ilişkili miyeloid lösemi

7. Blastik Plazmasitoid Dendritik Hücre Neoplazileri

2.1.4.3. Akut Myeloid Lösemi Hücrelerinde Sık Kullanılan İmmünolojik Belirteçler

Akut lösemi, değişen klinik, morfolojik, immonofenotipik, genetik ve moleküler özelliklere sahip heterojen bir maligniteler grubudur. Hücre popülasyonları üzerinde veya içinde bulunan antijenlerin varlığı ve yokluğu, hücre dizilerini tanımlayan karakteristik immün boyama sağlayan akut lösemilerin teşhisinde yardımcı olan çeşitli Monoklonal Antikorlar (MAb) tarafından tanınmaktadır. Akut lösemilerde, akım sitometri metodu kullanılarak yapılan immünfenotipleme tanı koymakla kalmayıp aynı zamanda prognozu, hedef tedavi için karar vermeyi ve hastalıkların alt tiplerinin değerlendirilmesini sağlayan hızlı ve güvenilir bir yöntemdir (20).

Habis miyeloid hücreler için ise spesifik belirteçler olmadığı için, malign hücre serisi normal hematopoietik hücre farklılaşması ile eşleştirilerek fenotipleme yapılır. Miyeloid hücreler için sık kullanılan immünolojik belirteçler Tablo 2-3'te gösterilmiştir (6).

Tablo 2-3: Miyeloid hücreler için sık kullanılan immünolojik belirteçler (6, 20)

Hücre Tipi	Genellikle Pozitif Marker	Genellikle Negatif Marker
Miyeloblastik	CD11, CD13, CD15, CD33, CD117, HLA-DR	CD14, CD10(cALLa), CD20
Miyelomonositik	CD11, CD13, CD14, CD15, CD32, CD33, HLA-DR	CD10, CD20
Eritroblastik	Glikoforin, spektrin, ABH antijenleri, Karbonik Anhidraz I, HLA-DR	CD10, CD20
Promiyelositik	CD11, CD13, CD15, CD33, CD14, HLA-DR	CD10, CD20
Monositik	CD11, CD13, CD14, CD33, HLA-DR	CD10, CD20
Megakaryoblastik	CD34, CD41, CD42, CD61, von Willebrand Faktör	CD10, CD20

2.1.4.4.Etiyoloji

Myeloid hücrelerin malign transformasyonuna neden olan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamasına rağmen, akut lösemi gelişimi için birçok çevresel ve genetik risk faktörü tespit edilmiştir. Bunlar arasında yaş, öncül hematolojik hastalıklar ve genetik bozukluklar, virüs enfeksiyonu, radyasyon ve çeşitli kimyasallara maruz kalma gibi etmenler bulunur. Lökemogenez, hematopoetik progenitör hücrelerin birçok aşamada farklı uyarıcı ajanlara duyarlılığını gerektiren çok adımlı bir süreçtir. AML'nin farklı alt türleri, belirli bir moleküler anormallik veya mutasyon ile indükleyici ajan arasında fonksiyonel bir bağ olduğunu düşündüren farklı mekanizmalara sahip olabilir. AML vakaları, bir ajana maruz kalma olmaksızın de novo olarak da ortaya çıkabilir. AML ile ilişkili birçok risk faktörü Tablo 2-4'te listelenmiştir (21).

Tablo 2-4: AML ile ilişkili risk faktörleri (21)

Akut Miyeloid Lösemi İle İlişkili Risk Faktörleri	
1.Genetik Bozukluklar	3. Kemoterapi
✓ Down Sendromu ✓ Klinefelter Sendromu ✓ Patau Sendromu ✓ Ataksi telenjipektazi ✓ Shwachman Sendromu ✓ Kostman Sendromu ✓ Nörofibrmatöz ✓ Fanconi Anemisi ✓ Li-Fraumeni Sendromu	✓ Alkilleyici ajanlar ✓ Topoizomeraz-II inhibitörleri ✓ Antrasiklinler ✓ Taksanlar
2. Fiziksel ve Kimyasal Maruziyetler	
✓ Benzen ✓ Pibobroman gibi ilaçlar ✓ Pestisit, herbisit ✓ Sigara kullanımı ✓ Mumyalama Sıvıları ✓ Terapötik olan ve terapötik olmayan radyasyon	

2.1.4.5.AML Patogenezinde Rol Oynayan Genetik Değişimler

AML'nin oluşumunda birçok mutasyon, spesifik translokasyonlar ve genetik değişimler rol oynar. Rastgele olmayan kromozomal anormaliler (delesyonlar, translokasyonlar), tüm erişkin primer AML hastalarının yaklaşık %52'sinde tanımlanmaktadır ve hastalığa teşvik eden genetik değişimler olarak kabul edilmiştir. t(8;21) (q22;q22), t(15;17) (q22;q12) ve inv(16) (p13.1;q22) de dahil olmak üzere bazı sitogenetik anormaliler daha uzun remisyon ve sağkalıma oranına sahipken kromozom 5 ve 7'deki değişimler, kompleks karyotipler (3'ten fazla kromozomda anomali) ve 11q23'teki değişikliklerde tedaviye kötü yanıt ve sağkalımda daha düşük oran gözlemlenmiştir. *NPM1*, *DNMT3A*, *FLT3*, *IDH*, *TET2*, *RUNX1*, *CEBPA*, *ASXL1*, *MLL*, *TP53*, *c-KIT* genlerinde meydana gelen mutasyonlar da AML patogeneziyle ilişkilidir (13).

2.1.4.6.Klinik

AML'nin klinik bulguları, lösemik hücrelerin (blast) proliferasyonu ya da normal hücrelerde azalmaya neden olan kemik iliği yetmezliğinden kaynaklanır. Lösemik hücreler dokulara sızabilir ve hepatomegali, splenomegali, cilt infiltrasyonu ve diş eti şişmelerine neden olabilir. Lösemik çoğalmanın yüksek hücre hasarına yol açan dolaylı bir etkisi olarak, hiperürisemi ve bazen böbrek yetmezliği ortaya çıkabilir. Hematopoezin baskılanması, anemi, nötropeni ve trombositopeninin klinik özelliklerine yol açar (22). En yaygın şikayet spesifik olmayan yorgunluk veya halsizliktir. Anemi, solgunluk, güçsüzlük ve solunum güçlüğüne neden olur. Ateş yaygın olarak görülür ve hastaların %15-20'sinde ortaya çıkan bir özelliktir. Burun, diş etleri, gastrointestinal kanal veya idrar yollarında meydana gelebilen çoğunlukla peteşi döküntüsü ve kolay morarma ile ortaya çıkan kanamalar da sık görülen durumlardır. Hastaların %20'sinden azında da kemik ağrısı görülür (23).

2.1.4.7.Tedavi

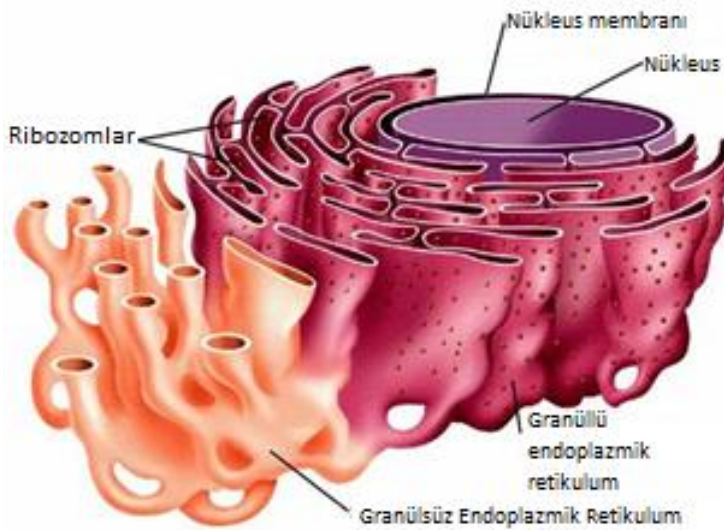
AML çok heterojen bir hastalık olduğundan farklı alt tiplerine sahip hastaların da hastalık belirtileri, tedavileri ve tedaviye yanıtları çeşitlidir (13). Kemoterapi, ışın tedavisi, hematopoetik kök hücre nakli (HSCT) AML tedavisinde kullanılan standart terapilerdir. Kemoterapötikler, DNA/RNA sentezini bloke eden anti-metabolitler ve

hematopoetik kök hücre nakli AML tedavisinde kullanılmasına rağmen çok sayıda yan etkiye ve sınırlamalara sahiptirler. Genomik ve proteomik teknolojiler, AML'nin moleküler biyolojisinin daha iyi anlaşılması ve AML alt gruplarının daha iyi karakterize edilmesiyle hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi için yeni fırsatlar sağlamaktadır (24).

2.2.Endoplazmik Retikulum ve Görevleri

Endoplazmik retikulum (ER), çekirdeği çevreleyen ve sitozole doğru genişleyen tübüller, vesiküller ve keselerden oluşan en büyük organdır (25, 26). ER, tüm canlı çekirdekli hücrelerde bulunur (25). ER' un tübülleri ve keseleri birbiriyle bağlantılıdır ve membranları da çekirdeğin dış zarının devamı şeklindedir. Bu nedenle, ER ve çekirdek membranları, ER lümen denilen ER'nin iç alanını tamamen çevreleyen devamlı bir tabakaya oluşturur. ER membranı, hücrenin toplam zarının yarısından fazlasını oluşturur (Şekil 2-2) (27, 28).

ER, morfolojik yapısına göre granüllü endoplazmik retikulum (ribozomların bağlandığı) ve granülsüz endoplazmik retikulum olmak üzere ikiye ayrılır. Granüllü ER, genel olarak salgı proteinlerinin sentezlendiği yerdir. Granülsüz ER ise daha çok lipid metabolizması ve detoksifikasyon olaylarını regüle eder (25). ER'nin başlıca görevleri; protein sentezi ve taşınması, protein katlanması, lipid ve steroid sentezi, karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesi ve kalsiyum depolamadır (26). Ayrıca salgı ve membran proteinleri de ER' de sentezlenir (29).



Şekil 2-2: Endoplazmik retikulum (30)

ER'ye giren yeni sentezlenmiş bir protein sinyal peptidi kesimi, N-bağlı glikolizasyon, dilsüfid bağları oluşumu gibi bir dizi post-translasyonel modifikasyona uğrar ve bir takım moleküler şaperonların ve katlanma enzimlerinin birleşimiyle birlikte de proteinin doğru katlanması ve ardından ER'den salınması sağlanır (31). Moleküler şaperonlar, kısmen katlanmış polipeptit zincirlerine bağlanırlar ve doğru katlanmayı sağlamaya yardımcı olurlar ve sadece doğru katlanmış ve birleştirilmiş proteinler Golgi aygıtına taşınır (28, 29).

2.2.1. Protein Katlanmasında Görev Alan Süreçler/Mekanizmalar

2.2.1.1. Disülfid Bağ Oluşumu

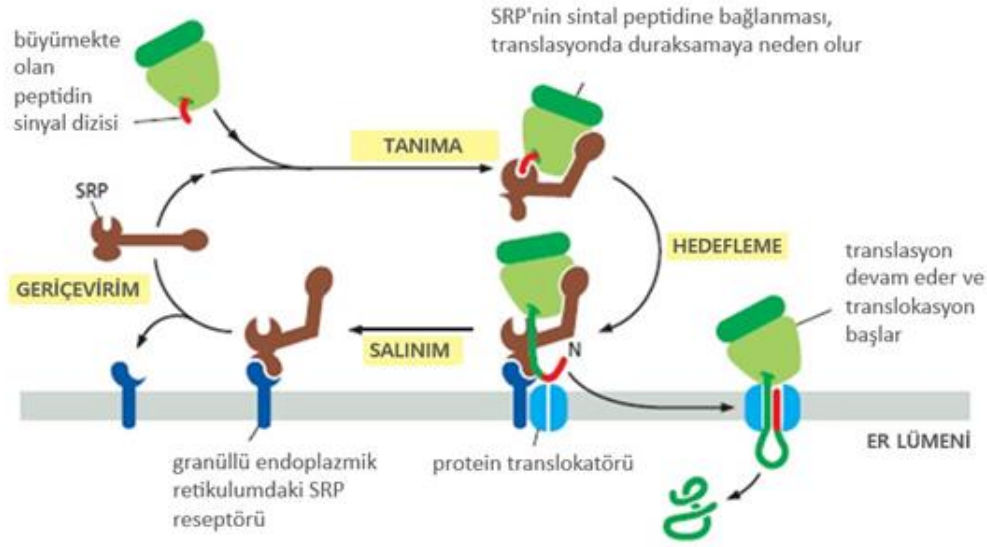
Proteinlerin en yaygın çapraz bağları, kovalent sülfür-sülfür(S-S) bağlarıdır. Katlanan proteinde komşu olan sistein yan zincirlerinin iki çift -SH grubunu birbirine bağlayan protein disülfid izomeraz enzimiyle (PDI) disülfid bağları oluşturulur. Disülfid bağları bir proteinin konformasyonunu değiştirmez, bunun yerine en çok tercih edilen konformasyonu güçlendirir (28).

2.2.1.2. Sinyal Peptidi Kesimi

Transmembran ve suda-çözünür proteinler benzeri proteinler, proteinlerin ER sinyal dizileri tarafından ER'ye yönlendirir ve daha sonra polipeptit zinciri tamamlanmadan önce ER zarındaki bir sinyal peptidaz tarafından kesilir (Şekil 2-3).

ER sinyal dizisinin proteini ER' a yönlendirebilmesi için;

- ✓ ER membranı ve sitozol arasında döngü oluşturan ve sinyal sekansına bağlanan bir sinyal tanıma partikülü (SRP),
- ✓ ER membranındaki bir SRP reseptörü olmak üzere en az iki bileşene ihtiyacı vardır.



Şekil 2-3: Sinyal peptidi kesimi (28)

SRP, büyük ribozomal alt birimin etrafını sarıp, bir ucu yeni oluşan polipeptit zincirinin bir parçası olarak ribozomdan çıkan ER sinyal dizisine bağlanan; diğer ucu ise, büyük ve küçük ribozomal alt birimler arasında bulunan arayüzdeki uzama faktörü bağlanma bölgesini bloke eden çubuk benzeri bir yapıdır. Bu blok, sinyal peptidi ribozomdan çıkarıldığında protein sentezini durdurur.

Geçici duraklama ribozoma, polipeptit zincirinin tamamlanmasından önce ER zarına bağlanmaya yetecek kadar zaman verir, böylece proteinin sitoplazmada serbest bırakılmamasını ve ayrıca, kompakt bir yapıya katlanabilen bir proteinin büyük bölümlerinin ER membranındaki taşıyıcıya ulaşmadan önce yapılmamasını sağlar. SRP sinyal dizisine bağlandığında, granüllü ER membranında bir transmembran protein kompleksi olan SRP reseptörü için bir bağlanma bölgesi ortaya çıkarır. SRP'nin reseptörüne bağlanması, SRP-ribozom kompleksini aynı zarda bulunan boş bir protein taşıyıcıya getirir. Sonra SRP ve SRP reseptör salınır ve taşıyıcı büyüyen polipeptid zincirini membranın üzerinden ER lümene aktarır (28).

Sinyal dizileri sadece hedefleme bilgileri içermez aynı zamanda proteinin katlanmasını, modifikasyonunu, lokalizasyonunu ve topolojisini de etkiler (31).

2.2.1.3. Glikolizasyon

Oligosakkaritlerin proteinlere kovalent olarak eklenmesi, ER'nin başlıca fonksiyonlarından biridir. ER'de en yaygın protein glikolizasyonu sırasında, 3 glukoz, 9

mannoz ve 2 N-asetil glukozaminden oluşan öncü bir oligosakkarit proteinlere bütün halinde aktarılır.

Bu oligosakkarit, protein içerisinde bir asparaginin yan zincir NH₂ grubuna transfer edildiğinden, N-bağlantılı veya asparagine bağlı olarak ifade edilir. Transfer, bir membrana bağlı enzim kompleksi olan oligosakkaril transferaz tarafından katalize edilir. Oligosakkaril transferazın bir kopyası, her bir protein taşıyıcı ile ilişkilidir, böylece gelen polipeptit zincirlerini etkili bir şekilde tarayıp glikozile eder. Öncü oligosakkarit, membrana bağlı dolikol lipid üzerindeki şeker ile şekillendirilir ve daha sonra proteine aktarılır. Şekerler ilk önce sitozolde nükleotid (UDP veya GDP)-şeker ara maddelerinin oluşmasıyla aktive edilir ve bu şekerler şekerini doğrudan veya dolaylı olarak düzenli bir sırayla lipide verir. Bu işlemin bir bölümünde lipid bağlı oligosakkarit, bir taşıyıcı yardımıyla ER membranının sitozolik tarafından lümenal tarafına geçer (28).

Bu protein modifikasyonları, bir proteinin stabilitesi ve konformasyonu üzerine içsel ve dışsal etkilere sahiptir. Yüklü hidrofilik karbonhidrat modifikasyonlarının eklenmesi, bir proteinin doğal fiziksel özelliklerini doğrudan değiştirir. N-bağlı glikanlar, izole proteinler için katlanmanın kinetik ve termodinamik özelliklerini geliştirebilirler (31).

2.3.ER Stres

Yeni sentezlenen proteinler, bir dizi moleküler şaperon ve katlanma katalizörleri yardımıyla katlandıkları ve birleştirildikleri ER'ye taşınır. ER'nin işlevinin bozulduğu durumlarda ER lümeninde katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinler çökme oluşturur, bu duruma ER stres adı verilir.

ER, sadece doğru katlanmış proteinlerin ER'den taşınabilmesini sağlamak için yüksek duyarlılıkta bir kalite kontrol sistemi sağlar. Katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinler ER'de kalır ve sonunda degrade olurlar (26, 32).

2.3.1.ER Strese Neden Olan Durumlar

Normal ER ortamındaki bir takım değişiklikler, yeni oluşan proteinlerin katlanmalarını etkiler. Örneğin; ER'de pH'nin azalması, polipeptitler üzerindeki yan zincirlerin yüklerini değiştirir. Düşük glikoz miktarı, hem yeni oluşan proteinlerin glikolizasyonunu hem de enerji üretimini engeller. Azalmış oksijen, ER ortamının daha indirgen olmasına neden olur bu da disülfid bağlarının oluşumunu engeller (33).

ER’de protein katlanma sürecini engelleyen ve sonrasında yanlış katlanmış ya da katlanmamış proteinlerin birikmesine neden olan biyokimyasal, fizyolojik ve patolojik durumlar şunlardır;

- ✓ ER kalsiyum depolarının tükenmesi,
- ✓ N-bağlı glikolizasyonun inhibisyonu,
- ✓ Besin yetersizliği, oksidatif stres, hipoksi,
- ✓ Golgi aygıtına protein taşınımının bozulması,
- ✓ ER protein sentezinin artması,
- ✓ ER-ilişkili degradasyon (ERAD) yolağındaki bozulmalar,
- ✓ Mutant ER proteinlerinin ekspresyonu,
- ✓ DNA hasarı ya da enerji düzensizliği/dalgalanmaları
- ✓ Enfeksiyon, pH değişiklikleri (26, 32).

2.3.2.ER Strese Neden Olan Kimyasallar

Tunikamisin, tapsigargin ve ditiyotretol (DTT) gibi kimyasallar, genellikle deneysel amaçlar için kültür hücrelerinde veya hayvanlarda ER strese yol açmak için kullanılır.

ER stresörlerin ilk grubu, glikolizasyon inhibitörlerini içerir. ER’de sentezlenen proteinlerin çoğu N-glikozillenir ve N-glikolizasyon protein katlanması için çoğunlukla gereklidir. Bu yüzden, N-glikolizasyonu bozan kimyasallar ER stresi indüklemeye potansiyeline sahiptir. Tunikamisin, N-glikozid bağı oluşumunu inhibe ederek glikoprotein sentezini bozan bir antibiyotiktir.

ER stresörlerin bir diğer sınıfı, kalsiyum metabolizmasını bozan kimyasallardır. ER’de kalsiyum iyonu konsantrasyonunun yüksek seviyede tutulması ve BiP gibi ER şaperonlarının da görevlerini yerine getirebilmesi için kalsiyum iyonlarına ihtiyaç duymasından dolayı, ER’de kalsiyum metabolizmasını bozan kimyasallar ER stresi indükler. A23187 gibi Ca^{2+} iyonoforlar ve Ca^{2+} pompa inhibitörü tapsigargin, ER strese yol açmak için sıklıkla kullanılır.

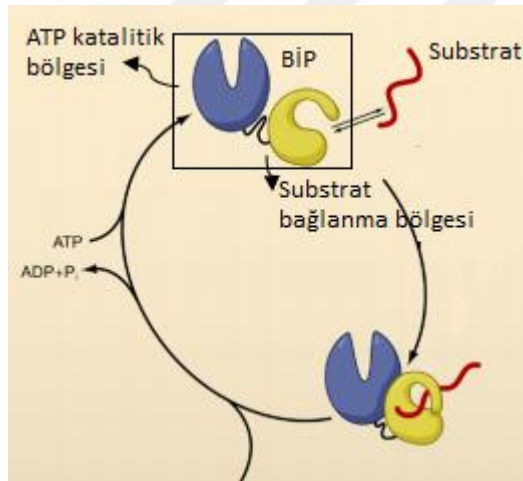
ER stresörlerin üçüncü kategorisi de indirgeyici ajanlardır. Disülfid bağlarının oluşumu, salgı proteinlerinin katlanması için önemlidir, disülfid bağlarını bozan indirgeyici ajanlar ER stresi harekete geçirir. DTT ve 2-merkaptoetanol bu amaç için uygulanan kimyasallardır (29).

2.3.3.ER Streste Rol Oynayan Şaperonlar ve Mekanizmalar

2.3.3.1.Bağlanma Proteini (BiP)/GRP78

Bağlanma proteini (BiP) diğer adıyla glukozla düzenlenen protein 78 (GRP78), ısı şok protein (HSP) 70 ailesine ait iyi bilinen bir ER şaperonudur (29). Olgunlaşmamış proteinlerin üzerinde açığa çıkan hidrofobik kısımlarla etkileşerek, ER lümendeki katlanmamış proteinleri seçici olarak bağlar.

Diğer HSP70 proteinlerine benzer şekilde, BiP'in de iki büyük bölgesi vardır. N-terminal bölgesi bir ATP katalitik alanı, C-terminal bölgesi ise substrat bağlanma bölgesi içerir. İki bölge, aktiviteyi düzenlemek için sırasıyla ATP'yi ve katlanmamış proteinleri bağlayıp serbest bırakarak iletişim kurar (Şekil 2-4).



Şekil 2-4: BiP'in bölgeleri

34 nolu kaynaktan modifiye edilmiştir.

ATP katalitik bölgeye bağlandığında, BiP'in C-terminal bölgesi katlanmamış proteinlere karşı düşük affiniteye sahip olur. Bununla birlikte, olgunlaşmamış proteinlerdeki hidrofobik kısımların varlığında, ATP'nin ADP'ye hidrolizi katalize edilir ve substrat bağlanma affinitesi artar.

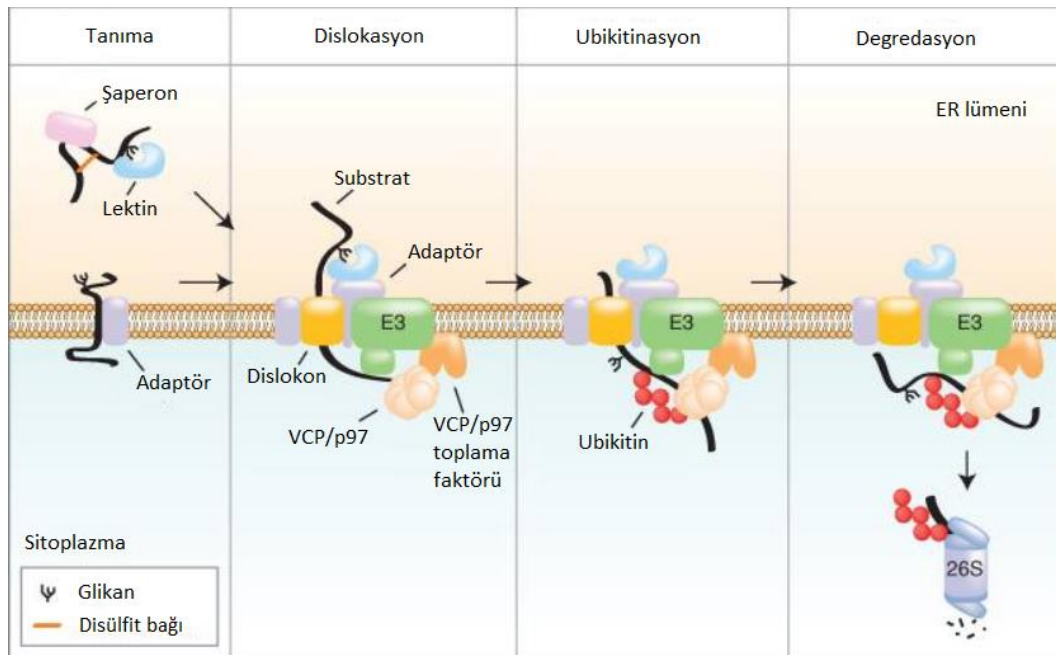
Böylelikle doğru katlanma için zaman sağlanır. Sonraki ATP-ADP değişimi protein substratını serbest bırakarak, yeni katlanmamış bir proteinin ya da hidrofobik

ER’de protein doğru katlanırsa, protein Golgi aygıtına taşınır. Glikoprotein doğru şekilde katlanamazsa, UGGT bir glukoz rezidüsünü oligosakkarit üzerine geri ekler ve böylece glikoprotein tekrar kalneksin/kalretikulin döngüsüne girer. UGGT, katlanmış ve katlanmamış proteinler arasında ayırım yapar, yalnızca katlanmamış proteinlere bir glukoz rezidüsü ekler (Şekil 2-5).

Bu şekilde glikozilasyon ve de-glukozilasyon döngüsü glikoprotein doğal konformasyonuna ulaşana kadar veya hedeflenmiş degradasyona kadar devam eder. Cnx/Crt döngüsünden çıkan katlanmamış proteinler, endoplazmik retikulum-ilişkili degradasyon (ERAD) mekanizmasına yönlendirilir (29, 37, 38).

2.3.3.3.ERAD Mekanizması

ER-ilişkili degradasyon (ERAD), doğru şekilde katlanan proteinlerin son hedeflerine taşınmasına izin veren ve hatalı şekilde katlanmış veya katlanmamış proteinlerin önce ER’da tutulması ve sonra degrade edilmesini sağlayan bir ER kalite kontrol mekanizmasıdır (39). Katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinler, ERAD mekanizması tarafından tutulur ve sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmaya taşınan proteinler, sitozolde übikütinlenir ve proteazom tarafından degrade edilir. Böylece ERAD süreci tanıma, taşıma, übikütinasyon ve degradasyon olmak üzere 4 adımdan oluşur (Şekil 2-6) (29).



Şekil 2-6: ERAD Mekanizması (40)

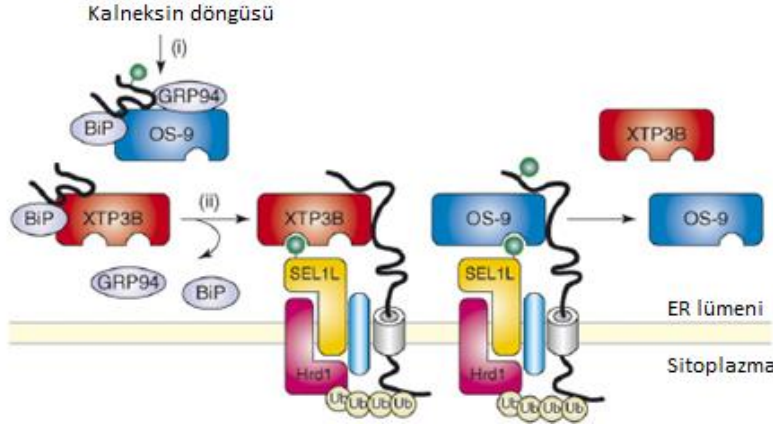
2.3.3.3.1.Katlanmamış/Yanlış katlanmış Proteinlerin Tanınması

Kalneksin döngüsü sırasında, yeni oluşan polipeptitlerin oligosakkariti 9 mannoz rezidüsü içerir. Bir mannoz rezidüsü, mannosidaz I (*ER ManI*) tarafından kesildiğinde, polipeptid kalneksin ve kalretikulinden ayrılır ve katlanan proteinlerden katlanmayan proteinleri ayıran, ER degradasyonunu arttıran alfa-mannosidaz benzeri proteine (*EDEM-ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein*) bağlanır (29). EDEM sadece yanlış katlanmış ya da katlanmamış proteinleri kalneksin döngüsünden çıkarır.

Osteosarkom 9 (OS9) ve XTP3-transaktive gen B (XTP3B) katlanmamış proteinlerin tanınmasından sorumlu ER-yerleşik glikoprotein olan diğer ERAD bileşenleridir. OS9 spesifik olarak, 8 (veya 5) mannoz rezidüsü içeren katlanmamış glikoproteine bağlanır. OS9, aynı zamanda glikozillenmemiş katlanmamış proteinlere bağlanır ve bu da glikolize edilmiş ve glikolize edilmemiş proteinlerin tanınmasında kritik rol oynadığını gösterir (29, 41).

2.3.3.3.2.Taşınma

OS-9 ve XTP3-B /Erlektin, SEL1L (*Lin-12 benzeri protein supresörü 1*) adaptörü vasıtasıyla taşıma kanalının yapısal bir proteini olarak önerilen ER-membrana gömülü ubiquitin ligaz HRD1'e (*HMG-CoA redüktaz degradasyon protein 1*) bağlanırlar (42, 43). Her iki protein de, substrat ile değil ancak SEL1L ile etkileşim için gerekli olan, korunmuş mannoz 6-fosfat reseptör homoloji (MRH) alanlarını içerir (17). SEL1L, OS-9 ve XTP3-B'ü HRD1 kompleksinin membran bileşenlerine bağlayan bir membran adaptörü görevi görür (Şekil 2-7) (42).



Şekil 2-7: Katlanamayan/yanlış katlanmış proteinlerin degradasyon için sitoplazmaya taşınması (42)

Taşınma mekanizmasının en önemli bileşenlerinden biri de, ubikülin füzyon degradasyon proteini 1 (Ufd1) ve nükleer protein lokalizasyon 4 (Npl4)'den oluşan bir kofaktör kompleksi ile etkileşime giren sitozolik ATPaz p97 (Valosin içeren protein-VCP)'dir (20). p97 direkt olarak HRD1 ve SEL1L'den oluşan ubikitin-ligaz kompleksine bağlanır ve protein zincirinin bir bölümü sitoplazmaya taşındığında, p97 ATPaz kompleksi tarafından yakalanır ve aynı zamanda poli-ubikitin zincirleri bağlanır. p97 ve onun yardımcı faktörü Ufd1/Npl4, proteazomal degradasyon için katlanmamış ER proteinlerini ER'den alarak sitoplazmaya toplar (29, 39, 40).

2.3.3.3.3.Ubikitinasyon

Ubikitinasyon, ökaryotik hücrelerin sitoplazması ve çekirdek plazmasında meydana gelen ve bir seri reaksiyon gerektiren bir posttranslasyonel modifikasyondur (44).

Taşınan (ya da taşınıyor olan) proteinlere, E1-E2-E3 ubikülin sistemi tarafından ubikitin eklenir. Ubikitin, önce Enzim 1 tarafından Enzim 2'ye birleştirilir ve sonra Enzim 3 tarafından ERAD substratlarına aktarılır (29).

2.3.3.3.4.Degradasyon

Katlanmamış ya da yanlış katlanmış membran ve luminal proteinler ERAD için seçildikten sonra sitozele taşınır ve ubikitin-proteazom sistemi (UPS) tarafından degrade edilir. Poliübikülinlenmiş proteinlerin degradasyonuna 26S proteazom kompleksi aracılık eder (43, 45).

2.3.4.ER Stres Cevabında Yapılanlar

Hücreler ER stresin üstesinden gelebilmek için bir dizi savunma mekanizmasını aktive eder. İlk olarak hücrede genel translasyon durdurularak, yeni proteinlerin sentezlenmesi engellenir. Daha sonra katlanma kapasitesini arttırmak için ER şaperon genleri ve ER-ilişkili degradasyonu arttırmak için ERAD bileşenlerinin genleri indüklenir.

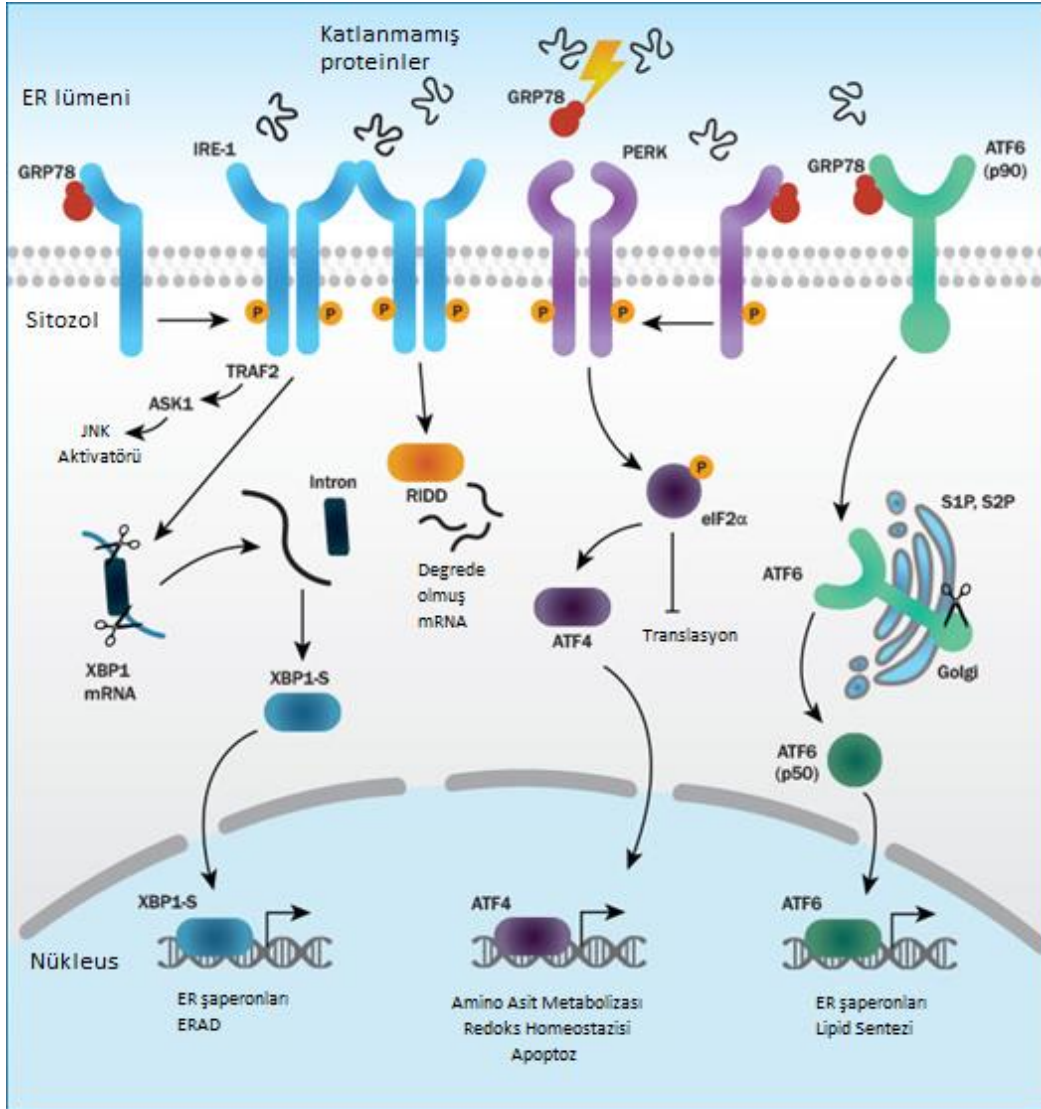
Organizmanın hayatta kalmasını ve ER stresle zarar gören ve düzeltilemeyen hücrelerin güvenli bir şekilde ortadan kaldırılmasını sağlamak için de hücreler apoptoza yönlendirilir (29).

2.4.Katlanmamış Protein Cevabı

Hücresin sağlığı ve sağ kalımı için önemli olan protein homeostazisi (proteostaz); proteinlerin translasyonu, katlanması, trafiği ve degradasyonu gibi koordineli düzenlemelerle sağlanır. ER, protein homeostazisinin korunmasında önemli bir rol oynar ve neredeyse tüm salgı polipeptitlerinin katlanması ve işlenmesinden sorumludur. Hücreler yaşamı boyunca, ER proteostazını bozabilecek çeşitli stres faktörleri ve fizyolojik durumlarla karşı karşıya kalırlar. Bu durumlar, çevresel hasara ve besin ulaşılabilirliğine cevap olarak salgı proteinlerinin üretimini dinamik olarak ayarlamaya ihtiyaç duyan bağışıklık ve metabolik hücreleri için özellikle önemlidir. Yeni sentezlenen katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinler, ER mekanizmasının tolere edilebilir eşiğinin ötesinde birikirse hücrede ER stres meydana gelir ve proteostazı sağlamak için ER-yerleşik sensörleri (Şekil 2-8), katlanmamış protein cevabı (UPR) adı verilen sinyal yollarını aktive eder. UPR, ER hacmini ve ER'ye bağlı şaperonların ekspresyonlarını arttırarak ve transkripsiyonel ve translasyonel olarak ER protein katlanma kapasitesini arttırır, yeni protein oluşumunu azaltır ve yanlış katlanmış/katlanmamış proteinlerin degradasyonunu sağlar (46, 47, 48).

UPR; protein kinaz R-benzeri endoplazmik retikulum kinaz (PERK), transkripsiyon faktörü 6 alfa aktive edici protein (ATF6 α) ve inositol gerektiren enzim 1 alfa (IRE1 α) adı verilen 3 ER-yerleşik sensör proteini tarafından indüklenir (Şekil 2-8). Bu üç sensör, onkogenik (onkogen veya tümör baskılayıcıları) veya çevresel (hipoksi, besin yetersizliği, pH) streslerine maruz kalan hücrelerdeki yaşam veya ölüm kararlarını sıkı bir şekilde denetler. UPR sensörleri tarafından stres algılamayla ilgili mekanizmalar, ER şaperon BiP/GRP78 tarafından kontrol edilir.

Bazal koşullar altında, BiP üç sensöre de bağlıdır ve böylece aktivasyonlarını engeller. ER strese, BiP'in IRE1, PERK ve ATF6'dan ayrılması ve bu sensörlerin kendi oligomerleşmesi ve ototransfosforilasyonuna izin vererek aktifleşmelerini sağlar (49).



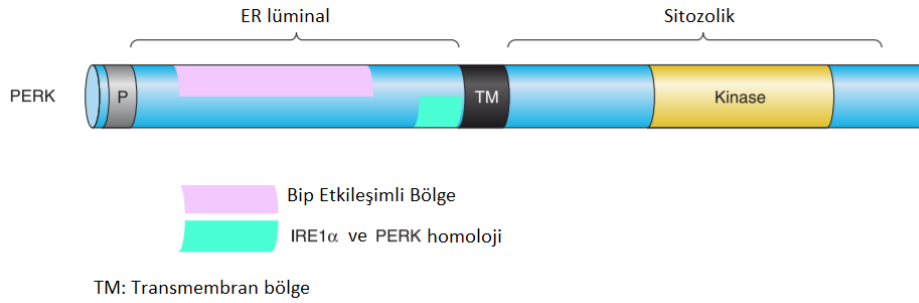
Şekil 2-8: Katlanmamış protein cevabı (UPR) yolları

Kaynak 50'den modifiye edilmiştir.

UPR ayrıca, ER fonksiyonlarının düzenlenmesi, mitokondri biyolojisi, lipid metabolizması ve apoptotik sinyal de dahil olmak üzere hücrel fizyolojinin diğer yönlerini de etkiler (51).

2.4.1.PERK Yolağı

PERK, C-terminal sitozolik bölgesinde serin/treonin kinaz aktivitesine sahip, N-terminal luminal bölgesiyle ise yanlış katlanmış proteinlerin birikimini tanıyan bir tip I ER transmembran proteindir (Şekil 2-10) (52).



Şekil 2-9: PERK (53)

PERK'in luminal bölgesinden BİP'in ayrılmasıyla, PERK'in oligomerizasyonu ve otofosforilasyonu sağlanır ve böylelikle PERK yolağı aktive olur. Oligomerizasyon ve otofosforilasyon yoluyla ER strese yanıt olarak aktive edildiğinde PERK, sitozolik protein kinaz bölgesiyle, ökaryot translasyon başlama faktörü eIF2 α 'nın α alt birimini Ser51 üzerinden doğrudan fosforiller. Bu fosforilasyon, eIF2'nin GTP-bağılı formuna reaktivasyonunu engeller ve hücre içinde genel translasyonu durdurarak ER'ye giren protein yükünü azaltır (52, 54, 55).

eIF2 α 'nın fosforilasyonu, aktive edici transkripsiyon faktör 4'ü (ATF4) kodlayan mRNA' nın seçici translasyonuna izin verir. ATF4; UPR genlerinin promoter veya hızlandırıcı (enhancer) bölgelerinde bulunan cAMP-cevap elementine(CRE) bağlanarak transkripsiyonlarını indükler (52, 54, 55, 56). Bu UPR genleri aminoasit metabolizması, inflamasyon, ER stresle indüklenmiş apoptoz, oksidatif stres, redoks homeostazında rol oynar.

PERK-eIF2 α -ATF4 yolağı, sağ kalım ve apoptozda rol oynadığı için her iki biyolojik fonksiyonla da ilişkilidir. Bu yolak, *CHOP* (C/EBP homolog proteininin) ve *GADD34*'ün (büyüme durdurma DAN-hasar indüklenbilir 34) transkripsiyonlarını aktive eder. CHOP, apoptozda rol oynayan bileşenleri kodlayan genleri regüle eder.

GADD34 ise genel translasyonel azalmanın sonlandırılması için protein fosfat 1'in (PP1) regülatör alt birimini kodlayıp eIF2 α 'yı defosforize eder (52, 55).

eIF2 α ayrıca PKR (dsRNA'ya bağı protein kinaz), GCN2 (aminoasit sentezinin genel kontrolü 2) ve HRI (*heme regulated translational inhibitör*) gibi diğer kinazlar tarafından da fosforile edilir. Bu kinazlar sırasıyla viral enfeksiyonlar, aminoasit starvasyonu ve heme yetersizliği ile aktive edilirler; bu da translasyonel zayıflamanın ve ATF4 indüksiyonunun sadece ER strese değil aynı zamanda bu fizyolojik durumlarla da indüklendiğini gösterir (29).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarla, PERK/p-eIF2 α /ATF4 yolağının sadece translasyonel kontrol için değil aynı zamanda ATF6'nın ve hedef genlerinin aktivasyonu için de gerekli olduğu gösterilmiştir. PERK yolağı, ATF6 sentezini ve ATF6'nın intramembran proteoliz ve aktivasyonu için ER' dan Golgi'ye taşınımını kolaylaştırır (55).

2.4.2.ATF6 Yolağı

ATF6; sitozolik bölgesinde bZIP transkripsiyon faktörü içeren, luminal bölgesi ise katlanmamış proteinlerin algılanmasından sorumlu olan bir tip II ER transmembran proteindir (Şekil 2-11). Memelilerde ATF6 α ve ATF6 β olmak üzere iki ATF6 geni vardır. Hem ATF6 α hem de ATF6 β , her yerde eksprese edilir ve ER'da sentezlenerek ER strese yanıt olarak düzenlenen intramembran proteoliz ile aktive edilirler (29, 52, 54, 56).



Şekil 2-10: ATF6 α (53)

ER stres yokluğunda, BiP ATF6'nın luminal alanına bağlıdır ve Golgi-lokalizasyon sinyalini engeller. Bu da ATF6 translokasyonunun inhibisyonuna yol açar (29).

BiP, ER'de yanlış katlanmış/katlanmamış proteinlerin birikmesine yanıt olarak ATF6'dan ayrılır ve ATF6'nın yanlış katlanmış/katlanmamış proteinlerle etkileşime

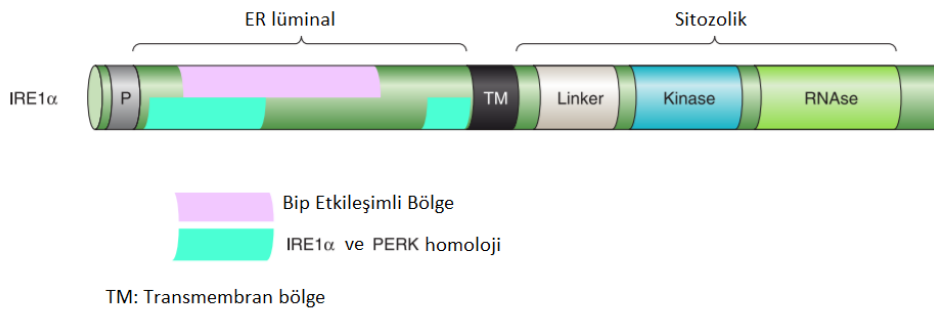
girmesini sağlar (52). BiP'in ayrılmasından sonra ATF6, PERK ve IRE1'in aksine, iki proteolitik bölünmeyle aktif formuna dönüştüğü Golgi aygıtına taşınır (57).

ATF6, sırasıyla luminal ve transmembran bölgelerinden site-1 proteaz (S1P) ve site-2 proteaz (S2P) tarafından kesilir. Kesilmenin sonucunda, bZIP alanı içeren ATF6'nın N-terminal sitozolik alanı [ATF6 (N)] çekirdeğe translokasyon yapar ve GRP78, GRP94 ve protein disülfid izomeras (PDI) gibi ER şaperonlarını ve enzimlerini kodlayan ER stres ilişkili genlerin promotörlerine bağlanarak onları indükler. ATF6 ayrıca, CHOP ve XBP1 de dahil olmak üzere diğer UPR hedeflerinin ve sonuç olarak EDEM, Derlin, HRD1, SEL1L ve Herp gibi ERAD bileşenlerinin de transkripsiyonunu regüle eder (52, 55, 57).

2.4.3. IRE1 Yolağı

IRE1-sinyal yolağı, mayalardan insanlara kadar olan türler arasında üç büyük UPR dalından en fazla korunmuş olanıdır (58). Memeli IRE1'i, sırasıyla ERN1 ve ERN2 tarafından kodlanan IRE1 α ve IRE1 β olmak üzere iki izoforma sahiptir. IRE1 α bütün hücrelerde eksprese edilirken, IRE1 β 'nın ekspresyonu gastrointestinal yolağın epitel hücreleri ile sınırlıdır (58, 59).

IRE1; N-terminal ER lümenal alan (IRE1-LD) ve serin / treoninkinaz ve C-terminal ribonükleaz (RNaz) bölgesi içeren sitozolik alandan oluşan iki enzimatik aktiviteli bölgeye sahip bir tip I transmembran proteindir (Şekil 2-12) (58, 60).



Şekil 2-11: IRE1 α (53)

ER'de katlanmayan/yanlış katlanmış proteinlerin birikimine yanıt olarak, BiP IRE1 α 'nın lümenal bölgesinden ayrılır. BiP' in ayrılması, IRE1 α 'nın dimerizasyonu ve otofosforilasyonunu sağlar ve IRE1 α yolağı aktifleşir. IRE1 α fosforilasyonu daha sonra

konformasyonel bir değişikliği tetikleyerek C-terminal endoribonükleaz aktivitesini aktive eder (46, 52, 56, 58, 59).

Memelilerde IRE1 α , XBP1 transkripsiyon faktörünün geleneksel olmayan bir mekanizmayla kesilmesiyle veya birçok substratın IRE1-bağımlı degradasyonu regülen eden süreç (*Regulated IRE1 α -dependent decay-RIDD*) yoluyla post-transkripsiyonel modifikasyonlarıyla UPR sinyalizasyonunu başlatır (61).

Aktif IRE1 α , endoribonükleaz aktivitesi vasıtasıyla, benzersiz bir sitoplazmik mRNA-kesilme reaksiyonuyla X-kutu bağlama proteini 1 (*X-box binding protein 1-XBP1*) mRNA'sını keserek, spesifik hedef UPR genlerini indükleyen son derece aktif transkripsiyon faktörü XBP1s'in (*XBP1-splicing*) translasyonunu sağlar (46, 59, 62).

IRE1 α ; mayalarda HAC1 mRNA'yı, bitkilerde bZIP60 mRNA'yı ve metazonlarda ise XBP1 mRNA'yı keserek onları UPR'de görevli aktif transkripsiyon faktörlerine dönüştürür (63).

şiddetli ER streste ER'de protein katlanma talebinin artmasını önlemek için, IRE1 α 'nın RNaz bölgesi, RIDD pro-apoptotik prosesiyle sekans spesifik olarak birçok ER-lokalize mRNA'yı, mikroRNA'yı, sitozolik ve ribozomal RNA'yı degrade eder. IRE1 α bu mekanizmayla glikoz metabolizmasının, inflamasyonunun ve apoptozun kontrolünde önemli bir biyolojik fonksiyona sahiptir (46, 56). 2006 yılında ilk olarak *Drosophila melanogaster*'da bulunan RIDD mekanizmasının memelilerde, füzyon mayalarında ve bitkilerde de korunmuş olduğu görölmüştür (63).

Protein katlanma kapasitesini arttırmak için IRE1 α , XBP1 mRNA'yı keserek transkripsiyon faktörü XBP1s'i oluşturur bu da ER kalite kontrol bileşenlerinin transkripsiyonunu indükler. Eğer ER homeostazı düzelmezse, IRE1 α , XBP1 mRNA'yı kesmeyi durdurur. Adaptif ve apoptotik cevap arasında oluşan bu geğiş aşamasında RIDD, ER şaperon BiP de dahil olmak üzere UPR hedef genlerinin degradasyonu ile ER stres yoğunluğunu artırır. ER stres yoğunluğu eşik değerine ulaştığında, RIDD, anti-apoptotik miR-17, miR-34a, miR-96 ve miR-125b pre-mikroRNA'ların baskılanması yoluyla apoptozu başlatır. Kaspaz-2 (CASP2), apoptoz için gerekli olan bir proapoptotik proteazdır. Bu miRNA'lar CASP2'nin translasyonunu baskılar ve RIDD mekanizmasıyla kesilmeleri bu başlatıcı proteazın ekspresyonunu artırır ve mitokondri-bağımlı apoptozu aktive etmesini sağlar (61, 63, 64, 65).

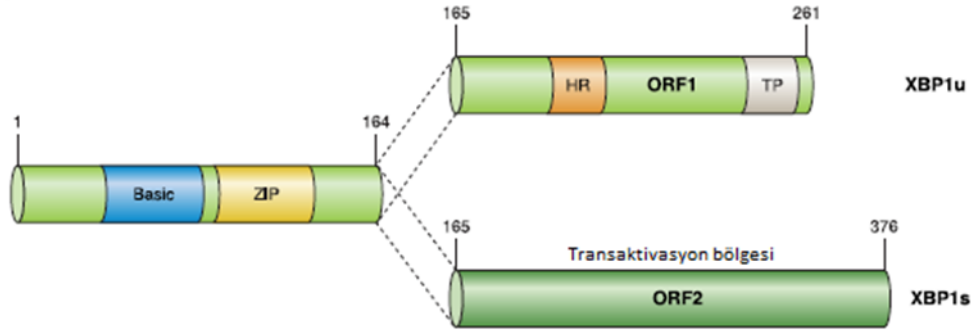
IRE1 α , farklı UPR yolaklarını aktifleştirmek için RNaz substrat özgüllüğünü ayarlar. Farklı substratları hedeflemek için IRE1 α 'nın bu özgüllüğü ayarlaması, fosforilasyon durumu, konformasyonel değişiklikler ve IRE1 α regülatörleri ile fiziksel bağların kombinasyonlarına bağlı olabilir (66). Memelilerde yapılan çalışmalarda, IRE1'in bu değişken RNaz aktivitesinin XBP1 mRNA kesimi ile daha çok hayatta kalım ve RIDD mekanizmasıyla ise apoptozu indüklemesi hücre kaderi üzerinde karşıt etkilere sahip olduğunu göstermiştir (63, 66).

IRE1'in, ER homeostazisinin düzenlenmesinin yanı sıra hücrel homeostaza da katkı sağladığı gözlemlenmiştir. Örneğin, kriptokrom sirkadiyen ritim 1/ kriptokrom sirkadiyen ritim 2 (CRY1 / CRY2)- aracılı sirkadiyen ritim, IRE1 α 'nın karaciğerdeki IRE1 α aktivitesini düzenlediği gösterilmiş, bu da IRE1 α 'nın, ER fonksiyonlarını sirkadiyen-ilişkili fizyolojik süreçlerin üstesinden gelebilmek için koordine ettiğini ortaya koymuştur. Bu gözlemler, IRE1 α 'ya bağlı UPR, sirkadiyen regülasyonu ve karaciğerin metabolik süreçleri arasında bağlantı oluşturur (67). Ayrıca, lipid homeostazındaki bozulmaların IRE1 α yolağıyla UPR'yi aktive ettiği ve PERK'in lipid-bağımlı UPR aktivasyonu için zorunlu olmadığı gösterilmiştir (68).

2.4.3.1.XBP1

XBP1(*X-Box Protein 1*), ilk olarak 1990'ların başında majör histokompatibilite kompleksi sınıf II (MHC-II) genlerinin promotör bölgelerinde bulunan *cis-acting* X kutusu motifine bağlanma kabiliyetine sahip bir temel bölge lösün fermuar (bZIP) proteini olarak tanımlanmıştır (55, 69, 70). Daha sonra ise, CREB/ATF(*cAMP responsive element binding protein/activating transcription factor*) ailesine ait bir transkripsiyon faktörü olduğu ve UPR hedef genlerini regüle ettiği bulunmuştur (55).

XBP1'in iki izoformu vardır; XBP1 kesilmiş (*XBP1s-splicing*) ve XBP1 kesilmemiş (*XBP1u-unsplicing*). XBP1s, UPR'de yer alan birçok genin transkripsiyonunu düzenleyen bir anahtar transkripsiyon faktörüdür. XBP1u ise transkripsiyonel aktivitesi olmayan inaktif bir formdur (Şekil 2-13) (55).



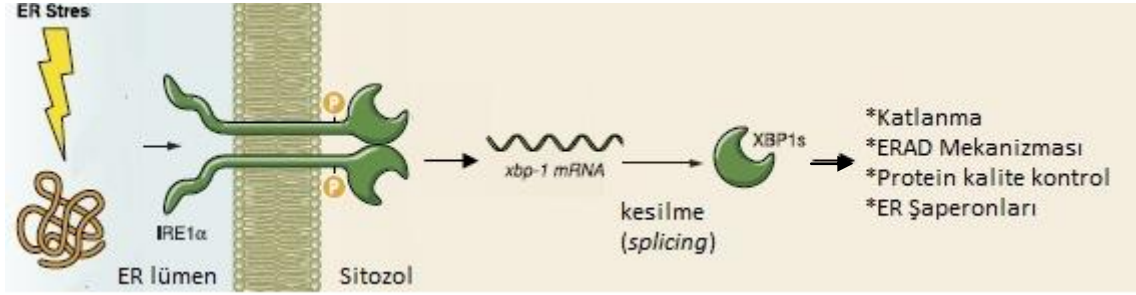
Şekil 2-12: XBP1s ve XBP1u formlarının şematik gösterimi (53)

Sayılar aminoasit pozisyonlarını gösterir. ORF: Açık okuma çerçevesi (open reading frame) HR: Hidrofobik bölge, TP: Translasyonu durdurma bölgesi

XBP1 mRNA'nın kesilme verimliliği, XBP1u tarafından kontrol edilir. XBP1u, kendi mRNA'sının ER membrana etkin bir şekilde hedeflenmesini sağlamak için TP (*Translational pausing*) bölgesi vasıtasıyla translasyonel duraklatmayı başlatır. Yeni sentezlenen XBP1u peptidinin üzerindeki hidrofobik bölge (*Hydrophobic region-HR*), XBP1u mRNA'sını ER zarına hedefleyerek aktif IRE1 α tarafından işlenmesini artırır (71).

Hücre içinde normal zamanlarda da XBP1s ile XBP1u arasında bir denge vardır. Uzun süreli ER stresinde, XBP1u birikir ve XBP1s'in proteazom-aracılı degradasyonu için sitozolde XBP1s ile kompleks oluşturur. Bu geribildirim döngüsü, uzayan ER stresten sonra XBP1'e bağlı cevapların zayıflamasına katkıda bulunduğu için, XBP1u'nun XBP1s'in negatif regülatörü olduğunu düşüncesini destekler (71).

IRE1 α 'nın oligomerizasyonu ve trans-otofosforilasyonu, proteinin sitozolik endoribonükleaz etkinliğini aktive eden konformasyonel değişikliğe neden olur (72). IRE1 α nükleaz aktivitesiyle, XBP1 mRNA'nın C-terminal bölgesinde bulunan 26 nükleotit dizisini keser (Şekil 2-14). Daha sonra tRNA ligaz RCTB (*tRNA splicing ligase from bacteria*) ile XBP1 mRNA'sı yeniden birleştirilir. Bu da XBP1'in durdurma kodonunun okunmasını sağlayan translasyonel çerçeve kaymasına neden olur. Böylelikle 261 aminoasitten (aa) oluşan XBP1u (*XBP1-unsplince*) proteinden kararlı ve hayli aktif olarak bilinen 376 aa sahip transkripsiyon faktörü XBP1s proteini oluşur (46, 72, 73, 74). Daha sonra XBP1s, UPR hedef genlerinin ekspresyonları düzenlemek için nükleusa translokasyon yapar (74).



Şekil 2-13: IRE1α/XBP1 yolağı

Kaynak 53'ten modifiye edilmiştir.

XBP1s'in aktivitesi, post-translasyonel modifikasyonlarla değişebilir. Fosfatidilinositol 3-kinazın p85α düzenleyici altbirimi XBP1s ile etkileşirse, XBP1s'in nükleer translokasyonu artar. MAPK p38 de XBP1s'i fosforilleyerek çekirdeğe translokasyonunu artırır. Asetilasyon ve sumolasyon sırasıyla XBP1s'in transkripsiyonel aktivitesini artırır veya zayıflatabilir.

Güçlü bir transkripsiyon faktörü olan XBP1s'in, UPR'yle ilişkili olarak transkripsiyonal hedefleri;

- ✓ Protein katlanmasında görev alan birçok foldaz, Hsp40 gibi ATPaz şaperonları (ERdj4, p58IPK ve HEDJ9)
- ✓ Redoks metabolizmasında rol oynayan oksidoredüktazlar,
- ✓ Veziküler trafiğe ve taşımaya dahil olan genler (Sec23a ve b gibi),
- ✓ Protein kalite kontrolünde, glikolizasyonda, ER' a protein girişinde ve ER biyogenezinde görev alan genler,
- ✓ ERAD mekanizması komponentleri (EDEM),
- ✓ Disülfid bağ oluşumuna katkıda bulunan protein disülfid izomeraz (PDI-P5) gibi şaperonlardır (46, 58, 69, 74, 71, 75).

XBP1s ayrıca, ER streste ER membranının genişlemesi için gerekli olan fosfolipid sentezini düzenler (71).

Birlikte, XBP1'e bağlı genlerin transkripsiyonu;

- ✓ ER şaperonları uyarıp protein katlanma kapasitesini artırarak,
- ✓ ER membran biyosentezinde artış sağlayarak,

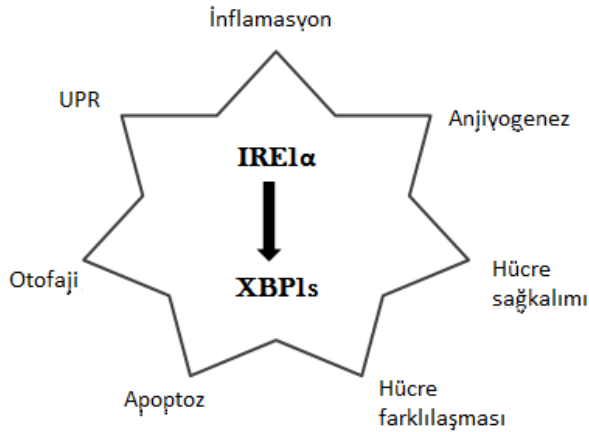
- ✓ Proteazomal ubiquitin yolu ile polipeptit retrotranslokasyonunu ve degradasyonunu uyararak ER stresi azaltmaya çalışır (74).

XBPls, UPR' den bağımsız olarak da;

- ✓ Pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini,
- ✓ Lipid ve heksozamin biyosentezini,
- ✓ HIF-1 α hipoksi cevabını,
- ✓ Hücresel farklılaşmayı regüle eder (58, 71).

2.4.3.1.1.XBP1'in Görev Aldığı Yolaklar

Son yıllarda yapılan çalışmalarla, IRE1 α -XBP1 yolağının inflamasyon, hücre sağkalımı, apoptoz, anjiyogenez ve hücre farklılaşmasındaki rolleri ortaya konmuştur (Şekil 2-15) (55).



Şekil 2-14: IRE1 α -XBP1 yolağının rol oynadığı durumlar

2.4.3.1.1.1.Hücre Farklılaşması

XBP1, erişkin dokuların çoğunda eksprese edilir. Fakat yapılan çalışmalar spesifik olarak bazı hücrelerin ve dokuların gelişimi için de XBP1'in önemli olduğunu ortaya koymuştur (76). Örneğin; XBP1 *knock-out* embriyoların şiddetli karaciğer hipoplazisi ve fetal anemiden doğduktan kısa süre içinde öldüğü gözlemlenmiştir bu da XBP1'in hepatosit büyümesi için önemli olduğunu gösterir. Ayrıca XBP1; pankreatik, tükürük bezi epitelyal ve Panet hücreleri gibi yüksek salgılama kapasitesine sahip hücrelerin gelişimi için gereklidir (55).

XBP1, adiposit farklılaşmasında rol oynar. Adipojenez sürecinde, XBP1 önemli bir adipojenik faktör olan C/EBP α 'nın (*CCAAT/enhancer binding protein α*) promotör bölgesine bağlanarak ekspresyonunu regüle eder (69).

XBP1, B hücrelerinin plazma hücrelerine terminal farklılaşması için önemlidir (71). XBP1, son aşama efektör CD8⁺ T hücrelerinin farklılaşmasında da rol oynar.

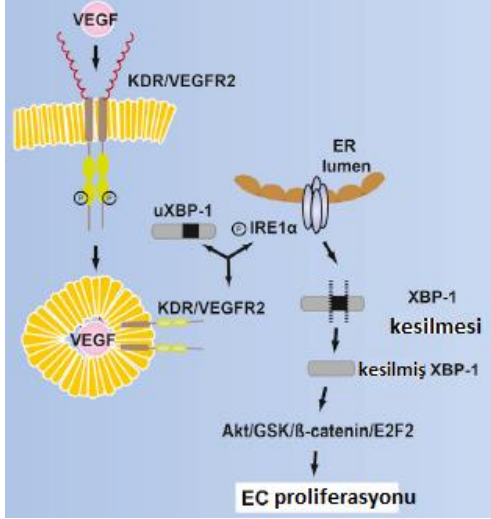
BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*), akson büyümesi ve hücre farklılaşmasını arttırmak için nöronlarda XBP1 mRNA kesilmesini aktive eder (69).

Miyeloid hücrelerin ve eozinofillerin progenitörleri, paralel ER stres sinyal yollarını uyarmadan IRE1 α ' yı ve Xbp1 mRNA'nın kesilimini seçici olarak aktive eder. XBP1-eksik oluşan eozinofillerde, sağkalım için gerekli olan granül proteinlerinin ağır defektlere sahip olduğu görülmüştür (77).

2.4.3.1.1.2. Anjiyogenez

Vasküler endotel hücre büyüme faktörü (VEGF), endotel hücrelerinin çoğalmasını regüle ederek anjiyogenezde önemli bir rol oynar (78). UPR'nin ATF4, XBP1s ve kesilmiş ATF6 gibi her üç kolundaki transkripsiyon faktörlerinin, VEGF'in promotör bölgesine bağlandığı ve onun transkripsiyonunu düzenlediği gösterilmiştir. XBP1s, VEGF'in promotöründe en az iki bölgeye bağlanma kapasitesine sahiptir (75).

Anjiyojenik programlar, ER lümenindeki katlanmamış proteinlerin birikiminden bağımsız olarak da UPR yollarını tetikleyebilir. Örneğin; VEGF, kinaz ekleme alanı reseptörüne (KDR / VEGFR2) bağlanarak bir kompleks oluşturur. Bu kompleks, IRE1 α ve XBP1u ile etkileşerek XBP1 kesilmesini kolaylaştırır. VEGF ile indüklenen XBP1 kesilmesi, Akt/GSK/ β -katenin/E2F2 yollarını aktive ederek (Şekil 2-16) endotel hücre büyümesi ve proliferasyonunda önemli rol oynar (75, 78).



Şekil 2-15: XBP1'in endotel hücre proliferasyonundaki rolü

Kaynak 75'ten modifiye edilmiştir.

Embriyonik gelişimde XBP1s'in etkisini incelemek için yapılan çalışmalarda, XBP1^{-/-} farelerinde plasental VEGF seviyelerinin normal olduğu görülmüştür. VEGF ekspresyonunun azaldığı ölümle sonuçlanan IRE1α^{-/-} embriyolarının aksine, XBP1-eksik embriyolarda yetersiz kan damarı gelişimi ve daha sonra retinal vaskülarizasyonda gecikme gözlemlenmiştir. Bu veriler IRE1α/XBP1 yolağının, fetal gelişimde plasentada veya embriyoda anjiyogenezi etkileyerek, embriyonik vaskülarizasyonda görev aldığını göstermektedir (75).

2.4.3.1.1.3. İnflamasyon

XBP1'in biyolojik fonksiyonu, UPR ve IRE1α ile ilişkilendirilmeden önce immünoloji alanındaki çalışmalarla keşfedilmiştir. UPR, dendritik hücreler ve makrofajlar da dahil olmak üzere immün hücre fonksiyonunun ve farklılaşmasının kontrolünde görev alır. XBP1 de bu hücrelerin çeşitli biyolojik yönlerini regüle eder (56).

Toll-benzeri reseptörler (TLR) gibi patojen sensörleri, spesifik saldırılara karşı uyarlanmış yanıtları düzenleyen transkripsiyonel programları aktive etmek için patojenleri tespit eder. TLR4 ve TLR2'nin spesifik olarak IRE1α - XBP1 yolağını aktive ettiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Makrofajlarda TLR'ler, XBP1 transkripsiyon faktörünün sitozolik kesimesini ve aktivasyonunu desteklemek için IRE1α'ya bağlanır. TLR aktivasyonu ile oluşan XBP1s, hücre içi patojenin etkin temizliği için gerekli olan interlökin 6 (IL-6), interferon-β (IFNβ) ve tümör nekroz faktörünün (TNF) optimal ve sürekli üretimi için gereklidir. TLR uyarımı ATF6 ve PERK sinyalizasyonunu bastırır,

klasik bir ER stres yanıtını tetiklemeden özellikle XBP1-bağımlı IL-6 üretimini indükler. Bazı kanıtlar da TLR'ler ile XBP1 mRNA kesilmesinin, proteinlerin yanlış katlanmasından bağımsız olduğunu göstermektedir (72, 75, 79).

XBP1'in aktivasyonu, aynı zamanda, MHC sınıf I-bağılantılı antijen sunumunu koordine eden bir anahtar protein olan TAP1 (*transporter of antigenic peptides-1*) gibi bağışıklık cevabı ile ilgili hedef genleri düzenleyen mikroRNA'ların üretimini de düzenler. Örneğin; miR-346 indüksiyonu, TAP1 protein seviyelerini büyük ölçüde azaltır ve ayrıca dolaylı olarak da HLA sınıf I mRNA'larının (HLA-B, HLA-C ve HLA-F) seviyelerini de azaltabilir (55, 72).

2.4.3.1.1.4. Apoptoz ve Hücre Sağ kalımı

XBP1 aktivasyonunun seviyesi ve süresi, hücre kaderi üzerindeki biyolojik etkiler için önemlidir. Hafif ER stres koşulları altında, XBP1 mRNA kesilmesi geçicidir ve hücrenin sağkalımına yöneliktir. Uzun süren ER stresten sonra XBP1s ekspresyonunun azalması, hücrelerin apoptoza maruz kalmasını hassaslaştırır (55, 56).

Örneğin; XBP1 kesilmesinin geçici aktivasyonu endotel hücre (EH) proliferasyonunu artırır. Sürekli aktivasyonu ise, çoklu kaspaz etkinliği ile apoptozise, endotelyum aşınmasına ve aterosklerotik lezyon gelişimine neden olur. Aynı zamanda XBP1s'in sürekli ekspresyonu; insülin, PDX1 (*Pancreatic And Duodenal Homeobox 1*) ve MAFA (*musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue A*) inhibisyonu yoluyla β -hücre disfonksiyonunu ve apoptozu indükler.

SUMO, çok sayıda proteini kovalent olarak modifiye edebilen ve Sentrin / SUMO' ya özgü proteazların (SENPs) bir ailesi tarafından tersine çevrilebilen ubikuitin benzeri bir proteindir. ER streste XBP1'in sumolasyonu, XBP1'in transkripsiyonel aktivitesini baskılar ve apoptoza yola açar (55).

2.4.3.1.1.5. Otofaji

ER streste, katlanmamış ve yanlış katlanmış protein agregatlarını ortadan kaldırmak için ERAD mekanizması aktive edilir. Yanlış katlanmış polipeptitler proteazoma taşınırken (ERAD I), büyük protein agregatları ise otofajinin aktive edilmesiyle öncelikli olarak ER' da işlenir (ERAD II). Hücresel işlevi sürdürmek amacıyla proteinlerin ve organellerin kalitesini korumak için, düşük düzeyde bir otofaji önemlidir.

XBP1s; ERdj4, HRD1, EDEM ve EDEM2 gibi ERAD bileşenlerini kodlayan majör genlerin transkripsiyonunu aktive eder (55).

Endostatin ile uyarılan XBP1 mRNA kesilmesi, EH'lerinde otofajik vezikül oluşumuna neden olan ve EH' nin hayatta kalmasına veya apoptoza yol açan otofajik bir yanıtı tetikler. XBP1s, otofaji belirteci BECLIN-1 ekspresyonunu promotörüne bağlanarak aktive eder. Aktive BECLIN-1, LC3-bII (mikrotübül ilişkili protein 1 hafif zincir 3-b) aktivasyonunu sağlayarak otofajik cevabı indükler (55, 69, 80).

IRE1 α / XBP1 yolağı ile otofaji / ERAD II indüksiyonuna, ER-membran taşıyıcı AT-1'in aktive edilmesi ve otofaji proteini Atg9A'nın asetilasyonunun dahil olduğu düşünülmektedir. Bu işlem sırasında, IRE1 α -XBP1 sinyalleme ilk olarak ER membrana, AT-1 membran taşıyıcısı aracılığıyla bir asetil-CoA akınına indükler. ER' un lümenindeki asetil-CoA seviyeleri, otofajiye bağlı ERAD' ın indüksiyonu için son sinyal olarak görev yapan Atg9A' nın asetilasyon durumunu belirler. Bu nedenle IRE1 α /XBP1 yolağı, hücrel stres yanıtını düzenlemek için UPR, ERAD ve otofajinin bütünleştirilmesinde önemli bir rol oynar (55, 69).

İntestinal epitelyal hücrelerinde XBP1'in delesyonu, PERK/eIF2/ATF4 yolağını aktive eden ve otofajiyi artıran ER stresine yol açar (55).

2.4.4.XBP1 Yolağı ve Kanser

Kanserde gözlemlenen mikroçevresel değişikliklere adaptif bir mekanizma olarak çalışan UPR, kanser hücrelerinin dönüşümünü tetikleyen, sağkalımını arttıran ve hücrenin metabolik durumunu ayarlayan mekanizmaları modüle eder. Bu şekilde UPR kanserde; anjiyogenezi, metastatik kapasitesiyi, ilaç direncini ve immünosüpresyonu arttıran bir bileşen olarak kabul edilir (46, 49, 73).

Kanser hücreleri, toksik koşullardan kurtulmak için sağ kalımı destekleyen IRE1 sinyal yolağını seçebilir. Artmış XBP1s seviyeleri birçok tümörde gözlenmiştir ve kötü prognozla korelasyon gösterir. Hipoksik koşullar altında kanser hücresi sağ kalımı için XBP1s'in gerekli olduğunu gözlemlenmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalar UPR'nin IRE1/XBP1 kolunun kemoterapiye karşı direnç sağlamada önemli olabileceğini göstermiştir (81, 82).

XBP1s, östrojeni regüle eden bir gendir ve meme kanserinde, XBP1s seviyeleri ile östrojen reseptörü- α ekspresyonu arasında güçlü bir korelasyon vardır. Bu düşünce ile tutarlı olarak, XBP1'in östrojen reseptör ekspresyonunu modüle ettiği gösterilmiştir. XBP1 ayrıca, östrojen reseptörü pozitif hücrelerde hücre sağkalımını kontrol edebilir. Östrojen reseptörü α -pozitif göğüs kanseri hücrelerinde de XBP1'in aşırı ekspresyonu, apoptoz ve hücre döngüsü ilerlemesiyle ilişkili genlerin yanı sıra östrojen kaynaklı tümör büyümesini de regüle ederek anti-östrojen direncine yol açabilir. XBP1s, HIF1 α hedef genlerinin ekspresyonunu düzenlemek için HIF1 α ile bir transkripsiyonel kompleksi oluşturarak, TNBC (*Triple-negative breast cancer*) hücrelerinin tümörjenisitesini ve progresyonunu arttırdığı yakın zamanda gösterilmiştir (49, 83).

UPR, multipl miyelom (MM) hücrelerinde oldukça aktiftir ve bu aktivite ilerlemiş hastalık aşamalarında daha da artmaktadır. Antijenik uyarılara yanıt olarak, germinal merkezdeki olgun B hücreleri, bir dizi transkripsiyon faktörünün koordineli ifadesini içeren antikor üreten plazma hücrelerine farklılaşır. Bu transkripsiyon faktörlerinden biri de plazma hücresi farklılaşması ve immünoglobulin üretimi için kritik bir rol oynayan XBP1'dir. Normal plazma hücre biyolojisindeki bu önemli rol doğrultusunda, XBP1s'in aşırı ekspresyonu çoğu MM olgusunda gösterilmiştir. XBP1'in aşırı ekspresyonunun prognostik rolü yakın zamanda klinikte tanımlanmıştır. Yüksek XBP1s seviyeleri, yeni teşhis edilmiş 253 hastadan alınan tüm örneklerde tutarlı bir şekilde saptanmıştır. XBP1u'ya oranla XBP1s'in yüksek seviyeleri, daha önceden bilinen diğer prognostik faktörlerden bağımsız olarak, düşük genel sağkalım ile doğrudan ilişkilidir (84).

Philadelphia kromozomu (Ph), 9. kromozomun 34. bölgesindeki Abl1(*Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*) geninin, 22. kromozomun 11. bölgesindeki BCR (*Breakpoint cluster region*) geni ile birleşerek oluşur. BCR-ABL1 tirozin kinaz füzyon geni çok zayıf sağkalım oranları ile ilişkili bir yüksek riskli bir altkümüeyi (Ph + ALL) tanımlar. Yapılan çalışmalar, BiP, IRE-1 α ve XBP1'in yüksek riskli Ph+ ve MLLr+ (*mixed lineage leukemia gene*) B-ALL alt kümelerinde artarak düzenlendiği göstermiştir. Ayrıca, BiP veya XBP1'in delesyonu, BCR-ABL1 B-ALL fare modellerinde apoptoza neden olmuştur. Ph + ALL alt kümelerinde, doğrudan BCR-ABL füzyon onkogenini hedef alan imatinib veya dasatinib gibi tirozin kinaz inhibitörler (TKI) başarılı bir tedavi için gereklidir.

Ph⁺ ALL primer vakalarında, imatinib tedavisinin XBP1 ekspresyonunu azalttığı görülmüştür. Bu, IRE-1 α / XBP1 yolağını bir TKI ile hedefleyen potansiyel bir ikili stratejinin yararlı olabileceğini düşündürmektedir. Klinik olarak, XBP1s'in yüksek ekspresyonu B-ALL'de ve alt tipi olan Ph⁺ ALL alt grubunda da zayıf prognozla korelasyon göstermiştir (85).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Gereç

3.1.1.Kullanılan Hasta Örnekleri

İstanbul Üniversitesi AZİZ SANCAR Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı'na AML tanısı için başvuran hastaların izole edilen RNA'larından translokasyon analizleri yapıldıktan sonra artan RNA örnekleri kullanıldı. Rastgele seçilen 100 hasta örneği ve bazı hastaların enstitüye analiz için tekrar gelişlerinde alınan örnekleri de çalışmaya dahil edildi. Yapılan çalışma için İstanbul Tıp Fakültesi klinik araştırmalar etik kurulu onayı alındı. Araştırma kapsamındaki olguların %45'ini (n=45) kadın, %55'ini (n=55) erkek oluşturmaktadır.

3.1.2.Kullanılan Kontrol Örnekleri

Sağlıklı kontrol grubu olarak Human Bone Marrow Total RNA (Clontech, USA cat no:636591) kullanıldı. Yaşları 22-85 arasında değişen 56 Asyalı erkek ve kadına ait kemik iliği örnekleri birleştirilerek elde edilen total RNA örneği kullanılmıştır.

3.1.3.Kullanılan Kitler

- ✓ *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit* (Roche, 05081955001)
- ✓ *LightCycler 480 SYBR Green I Master* (Roche, 04707516001)
- ✓ *PureLink, RNA Mini Kit* (İnvitrogen,1762380)

3.1.4.Kullanılan Cihazlar

- ✓ Buz Makinası (Cornelius)
- ✓ Buzdolabı -80 °C (Thermo Scientific)
- ✓ Buzdolabı +4 °C/-20 °C (Beko)
- ✓ Distile Su Cihazı (Milipore)
- ✓ Hassas Terazî (Kern)
- ✓ İnkübatör (Thermo Electron Corporation)
- ✓ Laminar Akışlı Steril Kabin (Nuanre)
- ✓ Mikrodalga Fırın (Arçelik)
- ✓ Mikroskop (Olympus)
- ✓ Nanodrop 2000 Spektrofotometre (Thermo Scientific)
- ✓ Otoklav (Sümer)

- ✓ Pipet Seti (Gilson)
- ✓ PZR Cihazı (Eppendorf, Mastercycler)
- ✓ Real Time PZR (Light Cycler 480-II, Roche)
- ✓ Santrifüj (Hettich)
- ✓ Sıvı azot tankı (StateBourne)
- ✓ Soğutmalı Masaüstü Santrifüj (Hettich)
- ✓ Su Banyosu (Memmert)
- ✓ Vorteks (Stuart)

3.2.Yöntem

3.2.1.Kalitatif PZR

Araştırmaya dahil edilen AML olgularında XBP1s varyantının olup olmadığını belirlemek için öncelikle hasta örneklerinin RNA'larından cDNA elde edildi. Solüsyon D'de bulunan bazı hasta örneklerinin de önce RNA'ları daha sonra cDNA'ları yapıldı.

3.2.1.1.sold' den RNA Elde Edilmesi

Solüsyon D'de bulunan hücrelerden RNA izolasyonu *PureLink, RNA Mini Kit* (İnvitrogen) kullanılarak aşağıdaki prosedüre göre yapıldı.

1. -80°C 'de buzdolabında bulunan örnekler çözüldükten sonra tüplerde bulunan solüsyon D+hücrenin mililitresine göre aynı miktarda %70'lik etanol eklendi. Eklendikten sonra iyice karıştırılarak daha sonra da vortekslendi.
2. Sonra karışım mini spin kolonlara aktararak oda ısısında 12.000g'de 15 saniye santrifüj edilerek RNA'nın filtreye bağlanması sağlandı.
3. Santrifüjden sonra altta kalan sıvı döküldü ve kolonun üzerine 700 ml *Wash Buffer I* eklendi ve tekrar 12.000g'de 15 saniye santrifüj edildi.
4. Altta kalan sıvı döküldü ve kolonun üzerine 500 ml *Wash Buffer II* eklenerek 12.000g'de 15 saniye santrifüj edildi. Santrifüjden sonra bu yıkama işlemi bir kez daha yapıldı.
5. Bağlanmış RNA'lı filtreyi kurutmak için 12.000g'de 2 dakika santrifüj edildi.
6. Yeni tüpe aktarıldıktan sonra filtrenin tam ortasına gelecek şekilde üzerine 30 µl RNaz içermeyen steril su koyuldu. 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten

sonra ≥ 12.000 g'de 2 dakika santrifüj edildi. RNA'nın suda çözünerek filtreden ayrılıp tüpe geçmesi sağlandı.

7. Elde edilen RNA'ların miktarı *Nanodrop-2000* cihazıyla belirlenerek -80°C 'de saklandı.

3.2.1.2. Hasta örneklerinin RNA'larından cDNA İzolasyonu

Örneklerin RNA'larından cDNA sentezi *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit* (Roche) kullanılarak aşağıdaki prosedüre uygun olarak yapıldı.

1. 1 μg Total RNA 9 μl olacak şekilde sulandırıldı.
2. RNA-Su karışımının üzerine 2 μl *random hexamer* ve 1 μl dNTP eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra 70°C 'de 10 dakika inkübe edildi ve buza alındı.
3. Üzerine; 4 μl 5X Tampon çözelti, 2 μl 0,1M Dithiothreitol (DTT), 1 μl RNaz İnhibitör (40U/ μl), 1 μl *Reverse Transcriptase* ile hazırlanmış karışımdan 8 μl eklendi.
4. PZR koşulları 37°C 'de 1 saat ve 94°C 'de 5 dakika olacak şekilde ayarlanarak uygulandı ve cDNA elde edildi.
5. cDNA örneklerinin miktarı *Nanodrop-2000* cihazı kullanılarak belirlendi.
6. Örnekler -20°C 'de saklandı.

Kalitatif PZR reaksiyonları 25 μl hacminde;

- ✓ 2,5 μl 10x PCR buffer (50 mM KCL; 10 mM Tris-HCL; 1,5 mM MgCl_2),
- ✓ 1,5 μl 2mM MgCl_2 ,
- ✓ 0,5 μl Primer F,
- ✓ 0,5 μl Primer R,
- ✓ 1,6 μl 2,5mM dNTP karışımı,
- ✓ 0,5 μl Taq DNA polimeraz,
- ✓ 1 μl cDNA içeren karışımla *Eppendorf, Mastercycler* PZR cihazına konuldu.

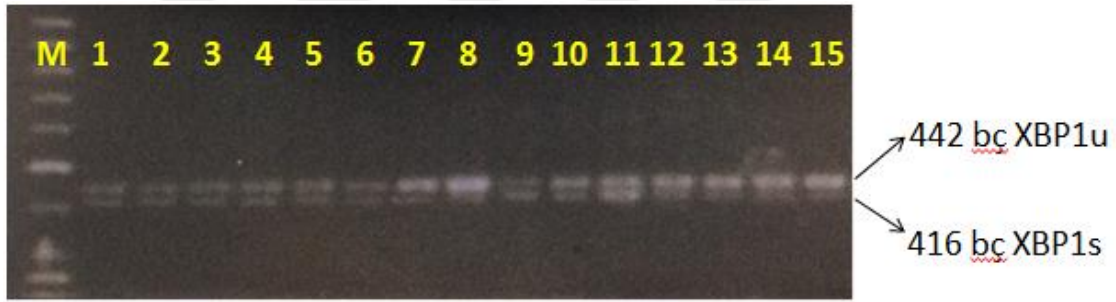
PZR koşulları 94°C’de 2 dakika (1 döngü) ön denatürasyondan sonra, 94°C’de 30 saniye, 57°C’de 30 saniye ve 72°C’de 30 saniye (35 döngü) ve son olarak 72°C’de 5 dakika olacak şekilde uygulandı.

XBP1 genine spesifik primerlerin dizileri Tablo 3-1’de gösterilmiştir.

Tablo 3-1: XBP1 genine ait primerler

GEN ADI	PRİMERLER	PZR Ürün Boyutu
XBP1-F	CCTTG TAGTTGAGAACCAGG	XBP1u-442nt
XBP1-R	GGGGCTTGGTATATATGTGG	XBP1s-416nt

Kalitatif PZR’den sonra elden edilen örnekler %3’lük agaroz jelde yürütülerek, XBP1s varyantının olup olmadığı bakıldı (Şekil 3-1).



Şekil 3-1: 15 AML olgusunda XBP1s ve XBP1u varyantları

M: 100bp ladder

3.2.2. Kantitatif Eş Zamanlı PZR (qRT-PZR)

Hastalara ait RNA örneklerinden elde edilen cDNA’lardan qRT-PZR yöntemiyle XBP1, HLA-B, BiP genlerinin ekspresyon düzeyleri belirlendi. Kantitasyon için eş zamanlı kantitatif PZR *LightCycler 480* cihazı ve *Light Cycler 480 SYBR Green I* kiti kullanıldı.

qRT-PZR reaksiyonunun karışım içeriği her gen için; 5 µl *SYBER Green I*, 1 µl primer F, 1 µl primer R, 1 µl H₂O ve 2 µl cDNA olarak hazırlandı.

qRT-PCR koşulları;

- ✓ Ön denatürasyon: 95°C’de 60 saniye (1 döngü)
- ✓ Amplifikasyon: 95°C’de 10 saniye, 62°C’de 30 saniye ve 72°C’de 10 saniye (45 döngü)

- ✓ Melting Curve analizi: 95°C’de 5 saniye, 65°C’de 1 dakika ve 97°C- ,
- ✓ Soğutma: 4°C’de 30 saniye olacak şekilde uygulandı.

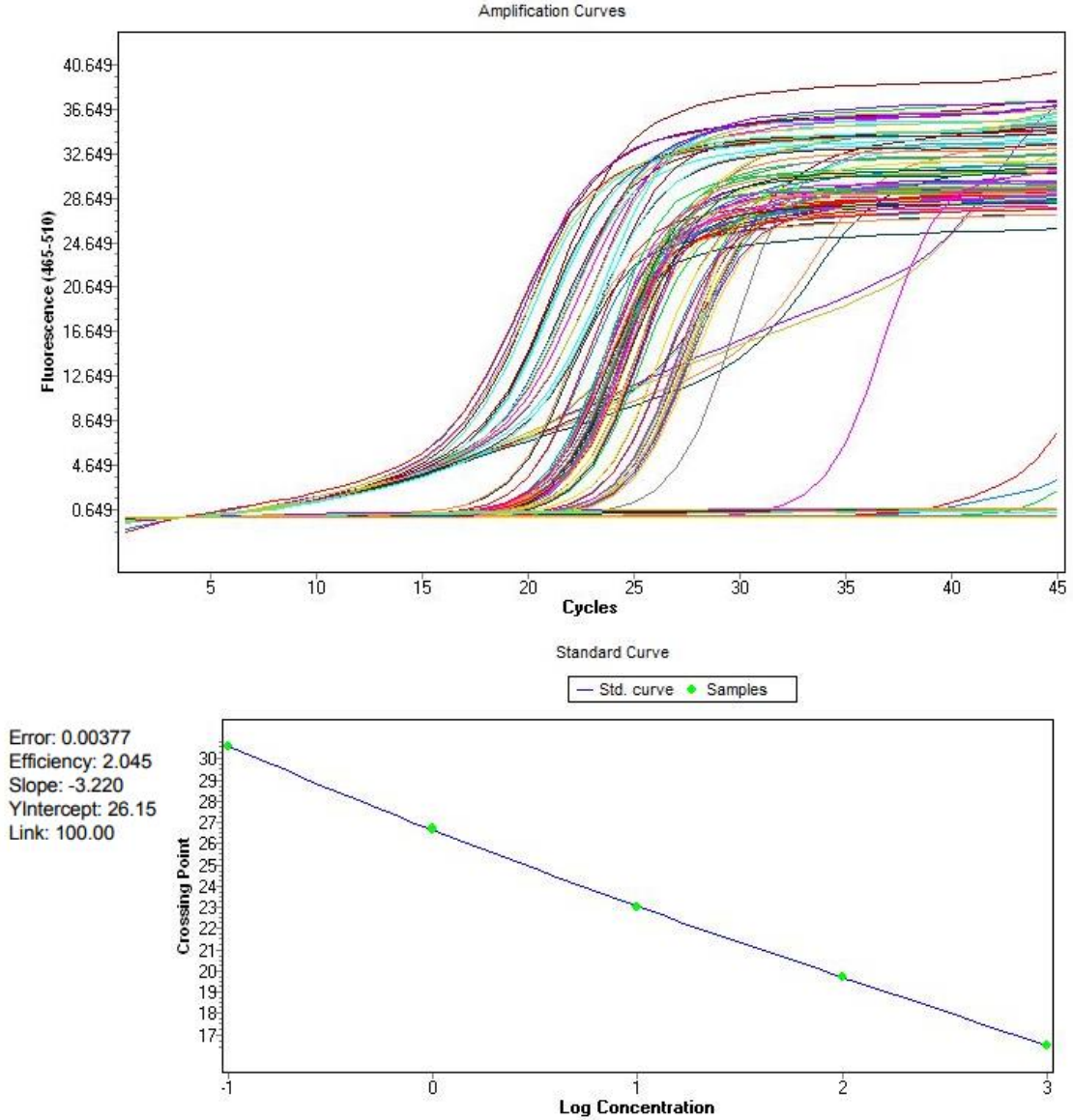
Her PZR reaksiyonu için negatif kontrol olarak cDNA yerine su kullanıldı. Standartlar için seri dilusyonlar hazırlanarak, her dilüsyon ve her örnek çift olarak çalışıldı. Hedef genlerin ekspresyon değerleri referans gen değerlerine bölünerek normalize edildi.

XBP1, HLA-B, BiP genlerine spesifik primerler ve referans gen olarak da 18SrRNA genine özgü primerler kullanıldı. Bu primerlerin dizileri Tablo 3-2’de gösterilmiştir.

Tablo 3-2: XBP1, HLAB, BiP ve 18SrRNA’ya spesifik primerler

GEN ADI	PRİMERLER	PZR Ürün Boyutu
XBP1s-F	AGGCTCGAATGAGTGAGCTGG	XBP1u-246nt
XBP1s-R	GCAGAGGTGCACGTAGTCTGA	XBP1s-220nt
HLA-B-F	TCAAGGTGTGAGAGACACAT	140nt
HLA-B-R	TCCTAGCAGTTGTGGTCATC	
BiP-F	GCAGGACATCAAGTTCTTGCC	192nt
BiP-R	GGTACCAGTAACAACATGCATGG	
18SrRNA-F	GGCCCTGTAATTGGAATGAGTC	207nt
18SrRNA-R	CCAAGATCCAACACTACGAGCTT	

Hastaların XBP1, HLA-B ve BiP ekspresyon değerleri belirlendi ve sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldı. Örneklerle ait standart eğri ve XBP1, HLA-B, BiP ve 18SrRNA genlerine ait amplifikasyon eğrileri Şekil 3-2’de gösterilmiştir.



Şekil 3-2: Örneklerle ait amplifikasyon ve standart eğrileri

3.3.İstatiksel Analiz

Çalışmada elde edilen veriler SPSS’20 istatistik programı ile analiz edildi. Verilerin analizinde elde edilen bulgular ortalama ve yüzde (%) olarak tablolarda gösterildi. Verilerin karşılaştırmasında, parametrik veriler için *independent sample T testi* ile

parametrik olmayan verilerin karşılaştırmasında non-parametrik test yöntemlerinden *Kruskal Wallis* ve *Mann Whitney U* testleri kullanıldı. Veriler arasındaki korelasyonu araştırmak amacıyla, *Pearson* ve *Spearman's* testi, nitel verilerin karşılaştırmasında korelasyon ve *Ki-Kare* testi uygulandı. $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Elde edilen veriler tablolar ile gösterilmiştir.



4. BULGULAR

Çalışmaya İstanbul Üniversitesi AZİZ SANCAR Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı'na başvuran hastalardan seçilen 100 AML olgusu ve kontrol olarak kullanılmak üzere 56 bireyden alınan sağlıklı kemik iliği örnekleri birleştirilerek elde edilen total örnek dahil edilmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak analiz edilerek bulgular tablolandırılmıştır.

HLA-B, BiP, XBP1 genlerinin ekspresyonları analiz edilen toplam 100 AML olgudan %45'i (n=45) kadın, %55'i (n=55) erkektir (Tablo 4-1).

Tablo 4-1: Cinsiyete göre AML olgularının dağılımı

Cinsiyet	N(Sayı)-Oran(%)
Kadın	45(%45)
Erkek	55(%55)
Toplam	100(%100)

Olgular 1-85 yaş aralığında olup, bunların %12'si (n=12) kız çocuk, %33'ü (n=38) yetişkin kadın, %10'u (n=10) erkek çocuk ve %45'i (n=45) yetişkin erkektir (Tablo 4-2).

Tablo 4-2: Çocukluk çağı ve yetişkin AML olgularının cinsiyete göre dağılımı

Cinsiyet	N(Sayı)-Oran(%)
Kız Çocuk	12(%12)
Yetişkin Kadın	33(%33)
Erkek Çocuk	10(%10)
Yetişkin Erkek	45(%45)
Toplam	100(%100)

AML olgularının HLA-B, XBP1 ve BiP ekspresyon değerleri Tablo 4-3’de gösterilmiştir. Ekspresyon değerleri normal dağılıma uymadığı için *One Sample Kolmogorov-Smirnov* testiyle ekspresyon değerleri hesaplanmıştır. 100 olgunun HLA-B ekspresyon değerleri 0,005 ile 2,10 arasında olup ortalama değeri 0,742’dir. BiP ekspresyon değerleri 0,022 ile 0,77 arasında olup ortalama değeri 0,162’dir. XBP1 ekspresyon değerleri ise 0,002 ile 0,22 arasında olup ortalama değeri 0,039’dur.

Tablo 4-3: Olguların HLAB, XBP1 ve BiP ekspresyonları

	Sayı(N)	En Az(Min)	En Çok(Max)	Ortalama	Standart Sapma
HLA-B	100	0,005	2,10	0,742	±0,710
BiP	100	0,022	0,77	0,162	±0,134
XBP1	100	0,002	0,22	0,039	±0,039

Çocukluk çağı (0-17 yaş) ve yetişkin (18 yaş ve üstü) AML olguları ile HLA-B, BiP ve XBP1 ekspresyon değerlerinin karşılaştırılması Tablo 4-4’de gösterilmiştir. Yapılan *Non-parametric independent samples* ve *Mann-Whitney U test*lerinin sonucunda yaş ile HLA-B, BiP ve XBP1 ekspresyonları arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p=0,215$; $p= 0,143$; $p= 0,527$).

Tablo 4-4: Çocukluk çağı ve yetişkin AML olgularının HLAB, BiP ve XBP1 ekspresyon değerlerinin karşılaştırılması

	Durum	N(Sayı)	Ortalama	Std. Sapma±	<i>p</i> (Anlamlılık)
HLA-B	Çocukluk	22	0,623	0,6214	0,215
	Yetişkin	78	0,775	0,7332	
BiP	Çocukluk	22	0,180	0,1166	0,143
	Yetişkin	78	0,156	0,1397	
XBP1	Çocukluk	22	0,038	0,0291	0,527
	Yetişkin	78	0,039	0,0423	

Olguların cinsiyeti ile HLA-B, BiP ve XBP1 ekspresyon değerleri arasında bir korelasyon olup olmadığını araştırmak amacıyla yapılan *Non-parametric independent samples* ve *Mann-Whitney U test*lerinin bulguları Tablo 4-5’te gösterilmiştir. HLA-B, BiP ve XBP1 ekspresyon değerleri ile olguların cinsiyetleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür ($p=0,366$; $p=0,615$; $p=0,737$).

Tablo 4-5: HLA-B, BiP, XBP1 ekspresyon değerlerinin cinsiyet ile karşılaştırılması

	Cinsiyet	N(Sayı)	Ortalama	Std. Sapma±	<i>p</i> (Anlamlılık)
HLA-B	Kadın	45	0,720	0,8181	0,366
	Erkek	55	0,760	0,6149	
BiP	Kadın	45	0,169	0,1266	0,615
	Erkek	55	0,155	0,1419	
XBP1	Kadın	45	0,041	0,0430	0,737
	Erkek	55	0,037	0,0369	

Tablo 4-6’da gösterildiği üzere, olguların BiP ile XBP1 ekspresyonları arasında anlamlı bir korelasyon olduğu ($p<0,001$) belirlenmiştir. Olguların HLA-B ve BiP ekspresyonları arasında da anlamlı bir değişim görülürken ($p=0,019$), HLA-B ve XBP1 ekspresyonları arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p=0,133$). Bu bulgulara göre, BiP ekspresyonu arttıkça XBP1 ekspresyonunun da artacağı, HLA-B ekspresyon değerleri yükseldikçe BiP ekspresyon değerlerinin de yükseleceği ya da XBP1 ekspresyonu arttıkça BiP ekspresyonunun da artacağı ve BiP ekspresyon değerleri yükselirse HLA-B ekspresyon değerlerinin de yükseleceği ifade edilebilir. HLA-B, BiP ve XBP1 ekspresyon değerleri ile lökosit sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon olmadığı gösterilmiştir ($p=0,124$; $p=0,280$; $p=0,976$). Aynı şekilde yaş ile HLA-B, BiP ve XBP1 ekspresyonları arasında da anlamlı bir değişim olmadığı gözlemlenmiştir ($p=0,283$; $p=0,315$; $p=0,429$).

Tablo 4-6: HLA-B, BiP ve XBP1 ekspresyonlarının, lökosit sayısı ve yaş ile karşılaştırması

	Korelasyon	HLA-B	BiP	XBP1	Lökosit	Yaş
HLA-B	r	1	0,235	0,151	-0,178	0,108
	P		0,019	0,133	0,124	0,283
	N	100	100	100	76	100
BiP	r	0,235	1	0,529	-0,126	-0,102
	P	0,019		<0,001	0,280	0,315
	N	100	100	100	76	100
XBP1	r	0,151	0,529	1	0,004	-0,080
	P	0,133	<0,001		0,976	0,429
	N	100	100	100	76	100
Lökosit	r	-0,178	-0,126	0,004	1	0,106
	P	0,124	0,280	0,976		0,361
	N	76	76	76	76	76
Yaş	r	0,108	-0,102	-0,080	0,106	1
	P	0,283	0,315	0,429	0,361	
	N	100	100	100	100	76

P: Anlamlılık r: Korelasyon katsayısı N: Sayı

Çalışılan 100 AML olgusunun t(15;17), t(8;21), inv(16) ve FLT3 sıklıkları Tablo 4-7’de gösterilmiştir. Olguların %84’ü (n=84) t(15;17) negatif, %16’sı (n=16) ise pozitifdir. Olguların %88’i (n=88) t(8;21) negatif, %12’si (n=12) pozitifdir. Olguların %92’si (n=92) inv(16) negatif, %8’i (n=8) ise pozitifdir. Olguların %98’i (n=98) FLT3 negatif, %2’si (n=2) pozitifdir.

Tablo 4-7: AML olgularının t(15;17), t(8;21), inv(16) ve FLT3 sıklıkları

	Pozitif Sayı(N)- Oran(%)	Negatif Sayı(N)- Oran(%)	Toplam(N)- Oran(%)
t(15;17)	16(%16)	84(%84)	100(%100)
t(8;21)	12(%12)	88(%88)	100(%100)
inv(16)	8(%8)	92(%92)	100(%100)
FLT3	2(%2)	98(%98)	100(%100)

Tablo 4-8’de olguların FAB grupları gösterilmiştir. FAB grubu bilinen 60 olgunun dağılımları şu şekildedir : 4 olgunun (%6,6) FAB grubu M0, 4 olgunun (%6,6) FAB grubu M1, 12 olgunun (%20) FAB grubu M2, 16 olgunun (%26,6) FAB grubu M3, 16 olgunun (%26,6) FAB grubu M4, 4 olgunun (%6,6) FAB grubu M5, 2 olgunun (%3,3) FAB grubu M6 ve 2 olgunun (%3,3) FAB grubu M7’dir.

Tablo 4-8: AML olgularının FAB grupları

FAB	N(Sayı)	Oran(%)
M0	4	6,6
M1	4	6,6
M2	12	20
M3	16	26,6
M4	16	26,6
M5	4	6,6
M6	2	3,3
M7	2	3,3
Toplam	60	100

Tablo 4-9’da gösterildiği gibi t(15;17), t(8;21), inv(16) ve FLT3 pozitif ve negatif olan olgular, HLA-B ekspresyonu açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir değişim gözlenmemiştir ($p=0,579$; $p=0,107$; $p=0,839$; $p=0,414$).

Tablo 4-9: HLAB ekspresyonunun t(15;17), t(8;21) ,inv(16) ve FLT3 pozitif ve negatif olgular arasında karşılaştırması

			N(Sayı)	Ortalama	Std.Sapma ±	P (Anlamlılık)
HLA-B	t(15;17)	Pozitif	16	0,917	1,118	0,579
		Negatif	84	0,708	0,606	
HLA-B	t(8;21)	Pozitif	12	0,436	0,254	0,107
		Negatif	88	0,783	0,742	
HLA-B	inv(16)	Pozitif	8	0,684	0,440	0,839
		Negatif	92	0,747	0,730	
HLA-B	FLT3	Pozitif	2	0,398	0,412	0,414
		Negatif	98	0,749	0,714	

Tablo 4-10'da t(15;17), t(8;21), inv(16) ve FLT3 pozitif olgularla negatif olguların BiP ekspresyonları karşılaştırılmıştır. t(15;17) pozitif olgular ve negatif olguların BiP ekspresyonları arasında anlamlı bir korelasyon bulunmuştur ($p<0,001$). Buna göre, t(15;17) pozitif olgularda BiP ekspresyonu t(15;17) negatif olgulara oranla daha fazladır. t(8;21), inv(16) ve FLT3 pozitif olgularla negatif olguların BiP ekspresyonları arasında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ($p=0,865$; $p=0,770$; $p=0,388$).

Tablo 4-10: BiP ekspresyonunun t(15;17), t(8;21), inv(16) ve FLT3 pozitif ve negatif olgular arasında karşılaştırması

			N(Sayı)	Ortalama	Std.Sapma±	<i>p</i> (Anlamlılık)
BiP	t(15;17)	Pozitif	16	0,279	0,104	<0,001
		Negatif	84	0,139	0,128	
BiP	t(8;21)	Pozitif	12	0,146	0,097	0,865
		Negatif	88	0,164	0,139	
BiP	inv(16)	Pozitif	8	0,129	0,078	0,770
		Negatif	92	0,164	0,138	
BiP	FLT3	Pozitif	2	0,080	0,065	
		Negatif	98	0,163	0,135	

t(15;17), t(8;21), inv(16) ve FLT3 pozitif olgularla negatif olguların XBP1 ekspresyonlarının karşılaştırılması Tablo 4-11'de gösterilmiştir. t(15;17) pozitif olgularla negatif olguların XBP1 ekspresyonları arasında anlamlı bir korelasyon görülmüştür ($p=0,015$). Bu korelasyon, t(15;17) pozitif olguların XBP1 ekspresyonlarının t(15;17) negatif olgulara göre daha fazla olduğunu göstermektedir. t(8;21), inv(16) ve FLT3 pozitif olgularla negatif olguların XBP1 ekspresyonları arasında ise anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir ($p=0,815$; $p=0,694$; $p=0,679$).

Tablo 4-11: XBP1 ekspresyonunun t(15;17), t(8;21), inv(16) ve FLT3 pozitif ve negatif olgular arasında karşılaştırması

			N(Sayı)	Ortalama	Std.Sapma±	<i>p</i> (Anlamlılık)
XBP1	t(15;17)	Pozitif	16	0,054	0,034	0,015
		Negatif	84	0,036	0,040	
XBP1	t(8;21)	Pozitif	12	0,050	0,061	0,815
		Negatif	88	0,037	0,035	
XBP1	inv(16)	Pozitif	8	0,036	0,024	0,694
		Negatif	92	0,039	0,040	
XBP1	FLT3	Pozitif	2	0,031	0,042	
		Negatif	98	0,039	0,039	

Tablo 4-12’ de kontrol ve hasta gruplarının HLA-B, BiP ve XBP1 ekspresyon değerleri istatiksel olarak karşılaştırılmıştır. Kontrol ve hasta gruplarının HLA-B ekspresyonları arasında anlamlı ters yönlü bir korelasyon saptanmıştır ($p=0,035$). BiP ve XBP1 ekspresyonları, kontrol ve hasta grubu arasında anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($p=0,598$; $p=0,565$).

Tablo 4-12: Kontrol ve hasta grubu arasında HLA-B, BiP ve XBP1 ekspresyon değerlerinin karşılaştırması

	Grup	N(Sayı)	Ortalama	Std. Sapma	<i>p</i> (Anlamlılık)
HLA-B	Kontrol Grubu	56	1,054	0,710	0,035
	Hasta Grubu	100	0,742	0,531	
BiP	Kontrol Grubu	56	0,181	0,153	0,598
	Hasta Grubu	100	0,162	0,134	
XBP1	Kontrol Grubu	56	0,024	0,011	0,565
	Hasta Grubu	100	0,039	0,039	

100 AML olgusuyla yapılan çalışmada, 15 olguda XBP1s varyantı bulundu. Bu olgulardan 6'sı kadın ve 9'u erkek olmak üzere yaş ortalamaları da 40,33'tür. XBP1s varyantı bulunan ve bulunmayan olguların yaş ve lökosit ortalamaları karşılaştırıldığında anlamlı bir sonuç bulunamamıştır ($p=0,882$; $p=0,091$). XBP1s varyantı bulunan 15 olgunun kanda bulunan blast oranı ortalaması 71,86 iken bu olguların FAB sınıflandırması da M2 (N=1), M3 (N=3) ve M4 (N=6) şeklindedir (Tablo 4-13).

Tablo 4-13: XBP1s varyantı bulunan olgularla XBP1s varyantı bulunmayan olguların yaş, cinsiyet, lökosit sayısı ve blast oranı açısından karşılaştırılması

		XBP1s(+) (N = 15)	XBP1S(-) (N = 85)	P(Anlamlılık)
Cinsiyet	Kadın(N)	6	39	
	Erkek(N)	9	46	
Yaş ortalaması		40,33(8-80)	43,86(1-85)	0,882
Lökosit Sayısı ortalaması		34784,62	27037,30	0,091
Blast Oranı ortalaması(Kan %)		71,86	48,16	
	M0	-	4	
	M1	-	4	
	M2	1	11	
	M3	2	14	
	M4	6	10	
	M5	-	4	
	M6	-	2	
	M7	-	2	

Tablo 4-14’de XBP1s varyantı bulunan olgularla XBP1s varyantı bulunmayan olguların HLA-B, BiP ve XBP1 ekspresyonları karşılaştırılmıştır. XBP1s varyantı bulunan olgularla XBP1s varyantı bulunmayan olgular arasında anlamlı bir korelasyon gözlemlenmiştir ($p=0,003$).

Tablo 4-14: XBP1s varyantı bulunan olgularla XBP1s bulunmayan olguların karşılaştırılması

	Grup	N(Sayı)	Ortalama	Std. Sapma	p (Anlamlılık)
HLA-B	XBP1s (+)	15	0,430	0,303	0,05
	XBP1s (-)	85	0,793	0,749	
BiP	XBP1s (+)	15	0,127	0,014	0,186
	XBP1s (-)	85	0,167	0,030	
XBP1	XBP1s (+)	15	0,018	0,041	0,003
	XBP1s (-)	85	0,042	0,016	

Tablo 4-15’te XBP1s varyantı bulunan ve bulunmayan olgularda t(15;17), t(8;21), inv(16), FLT3 ve bu değişimlere sahip olmayan negatif gruplardaki dağılımı gösterilmiştir. XBP1s varyantı bulunan 15 olgudan 2’si t(15,17), 1’i inv(16) ve 1’i de FLT3 mutasyonu taşıırken, geriye kalan 11 olgu bu değişimlere sahip değildir.

Tablo 4-15: XBP1 varyantının bulunduğu olguların sınıflandırılması

	XBP1s(+) (N=15)	XBP1(-) (N=85)	Toplam (N=100)
t(15;17)	2	16	18
t(8;21)	-	12	12
inv(16)	1	7	8
FLT3	1	1	2
Negatif	11	49	60

Yeni tanıli olgularla indüksiyon tedavisi sonrası (2.geliş) HLAB, BİP ve XBP1 ekspresyonları karşılaştırılması yapılan 10 AML olgusunda anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır (Tablo 4-16) ($p=0,508$; $p=0,333$; $p=0,241$).

Tablo 4-16: Yeni tanıli olgularla tedavi sonra gelişlerinin HLAB, BİP ve XBP1 ekspresyonlarının karşılaştırılması

	Olgu Sayısı(N)	Ortalama	Std.Sapma	p(Anlamlılık)
Diğer gelişler-HLAB (1.geliş-2.geliş)	10	1,059	1,394	0,508
		1,092	0,562	
Diğer gelişler-BiP (1.geliş-2.geliş)	10	0,1853	0,1050	0,333
		0,1688	0,1318	
Diğer gelişler-XBP1 (1.geliş-2.geliş)	10	0,0480	0,0372	0,241
		0,0522	0,0937	

Yeni tanıli olgularla tedavi sonrası 3.gelişlerinin HLA-B, BiP ve XBP1 ekspresyonları karşılaştırılması yapılan 5 AML olgusunda anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır (Tablo 4-17) ($p=0,138$; $P=0,893$; $P=0,225$).

Tablo 4-17: Yeni tanıli olgularla tedavi sonra gelişlerinin HLA-B, BiP ve XBP1 ekspresyonlarının karşılaştırılması

	Olgu Sayısı(N)	Ortalama	Std.Sapma	p(Anlamlılık)
Diğer gelişler-HLAB (1.geliş-3.geliş)	5	0,5057	0,4061	0,138
		0,8038	0,3286	
Diğer gelişler-BiP (1.geliş-3.geliş)	5	0,1140	0,0933	0,893
		0,0956	0,0359	
Diğer gelişler-XBP1 (1.geliş-3.geliş)	5	0,0397	0,0249	0,225
		0,0205	0,0091	

Tablo 4-18’de t(15;17) ve inv(16) sitogenetik değişimlerine sahip 3 AML olgusunda bulunan XBP1s varyantının tedavi sonrası 2.gelişlerindeki hala t(15;17) pozitif ve inv(16) pozitifken durumları gösterilmiştir. Tedavi sonrası 2.gelişlerinde bu 3 AML olgusunda XBP1s varyantı bulunamamıştır.

Tablo 4-18: AML olgularının tedavi sonrası 2.gelişlerinde XBP1s varyantının durumu

	1.geliş-XBP1s(+)	2.geliş-XBP1s(-)
t(15;17)	2	-
inv(16)	1	-

Miyeloperoksidaz (MPO), AML prognostik faktörlerinden biridir. XBP1s varyantı bulunan 6 AML olgusunda MPO(+) olduğu görülmüştür(Tablo 4-19).

Tablo 4-19: MPO(+) AML olguları

	MPO(-)	MPO(+)
N(Sayı)	6	9

5. TARTIŞMA

Akut miyeloid lösemi (AML), günümüzde hala tam olarak etyolojisi aydınlatılmamış olmakla birlikte birçok genetik ve çevresel faktörün etkili olduğu malign bir hastalıktır (9, 11, 12). *American Cancer Society*'nin 2015 yılı verilerine göre yaklaşık 20.830 yeni vaka tespit edilmiş ve 10.000'den fazlası ölümle sonuçlanmıştır (16). Tanı yaşı ortalama 66 olan ve daha yaşlı AML olguları için sağkalım oranı % 10'dan azdır ve tedavi yanıtı son otuz yıl içinde önemli ölçüde değişmemiştir. Genç hastalarda remisyon oranları daha umut verici olsa da bu popülasyonda da, sonuçta hastaların ilk 5 yılında %50'sinde nüks görülmektedir (85).

Geleneksel olarak AML'nin patogenezi üzerine yapılan araştırmalar, proliferasyonu düzenleyen tümör baskılayıcı genlerin veya onkojenlerin analizine odaklanmıştır. Miyeloid hücrelerin normal farklılaşmanın bozulması AML'nin başka bir ayırıcı özelliğini temsil eder, çünkü lösemik blastlar tipik olarak belirli bir aşamada normal farklılaşma sürecini engelleyici rol oynar. Bazı kanser kök hücrelerinin bir özelliği de, ER strese yol açan, ER'da yanlış katlanmış proteinlerin birikmesiyle tetiklenen katlanmamış protein tepkisinin aktivasyonudur (86). ER stres uzar ve UPR, ER homeostazı düzeltmekte başarısız olursa, kanser hücrelerinde apoptoz yolları indüklenir. Gelecekte, UPR'nin bu etkisi hedeflenerek kanser hücrelerinde sağ kalımdan apoptoza gidiş sürecini hızlandıran bir tedavi geliştirilebilir (87).

UPR sinyal yollarından biri olan IRE1 α , hücre ER strese girdiğinde XBP1 genini keserek hayli aktif bir transkripsiyon faktörü olan XBP1s'in transkripsiyonunu sağlar. XBP1s; protein katlanması, salgılama ve ERAD mekanizmasında rol alan genleri indükleyerek hücrenin sağkalımında rol oynar. Yapılan çalışmalarla, meme kanseri, multipl miyelom, glioblastoma, B-ALL ve alt tiplerinde XBP1 ekspresyon seviyelerinin arttığı gözlemlenmiş, XBP1 yolağının tümör progresyonunda rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca IRE1/XBP1 sinyal yolağı metastatik progresyon ve kemoterapiye direnç ile ilişkilendirilmiştir (73, 87).

Çalışmamıza dahil edilen 100 AML olgusunun 15'inde (%15) XBP1s varyantı analiz edilerek UPR'nin aktivasyonu belirlenmiştir. Schardt ve ark. da çalışmamıza benzer olarak 105 AML olgusunun 17'sinde (%16.2) XBP1s varyantı bulmuştur (86).

Buna ek olarak farklı bir çalışmada ise BiP, IRE-1 α ve XBP1 ekspresyonlarının yüksek riskli Ph⁺ ve MLLr⁺ (*mixed lineage leukemia gene*) B-ALL alt kümelerinde artarak düzenlendiği gösterilmiştir. Bu çalışmada çalışmamızdan farklı olarak ALL olguları kullanılmıştır fakat sonuçları çalışmamızla pozitif korelasyon göstermektedir.

AML patogenezinde t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q12) ve inv(16) (p13.1;q22) sitogenetik değişimleri ve *NPM1*, *DNMT3A*, *FLT3*, *IDH*, *TET2*, *RUNX1*, *CEBPA*, *ASXL1*, *MLL*, *TP53*, *c-KIT* genlerinde meydana gelen mutasyonlar rol oynar (13). AML patogenezinde rol oynayan genetik değişimlerden olan FMS-benzeri tirozin kinaz 3 geninde (FLT3-ITD) meydana gelen iç tandem duplikasyonları kötü prognozla ilişkilendirilirken, t(8;21), t(15;17) ve inv(16) kromozom anomalileri daha uzun remisyon ve sağkalıma oranına sahiptir. AML'nin APL alt kümesinin ana onkogenik etkeni de t(15;17) (yani PML-RAR α) dengeli translokasyonudur (85).

Çalışmamızda XBP1s varyantı bulduğumuz 15 AML olgusunun içerisinde, t(15;17) taşıyan 2 olgu, inv(16) taşıyan 1 olgu ve FLT3 mutasyonuna sahip 1 olgu ve bu spesifik değişimleri içermeyen 11 AML olgusu bulunmaktadır. Schardt ve ark. yaptığı çalışmada XBP1s varyantının bulunduğu AML olgularında alt tipler ise şöyledir; FLT3 mutasyonuna sahip 1 olgu, NPM1 mutasyonuna sahip 4 olgu, CEBPA mutasyonuna sahip 1 olgu, t(15;17) taşıyan 3 olgu, t(8;21) taşıyan 1 olgu ve kötü ve orta risk taşıyan gruplara sahip 13 olgudur (86). Bu çalışmadan farklı olarak sonuçlarımızda inv(16) kromozomal anomalisini taşıyan 1 olguda da XBP1s varyantı gözlenmiştir. Ayrıca her iki çalışmada özellikle t(15;17) taşıyan olgularda XBP1s varyantının bulunması AML'nin alt tipi olan APL'nin prognozunda UPR yollarının aktif ve XBP1s'in de önemli bir role sahip olduğunu düşündürmektedir.

Kantitatif eş zamanlı PZR ile yapılan bir diğer çalışmamızda AML'de sık görülen t(8;21), t(15;17) ve inv(16) sitogenetik anomalilerine ve FLT3 mutasyonuna sahip olan 38 AML olgusu ve bu değişimlere sahip olmayan 62 AML olgusunda UPR sinyal yolağında görev alan XBP1, BiP genlerinin ve ER aracılı yoldaki etkisini belirlemek için HLA-B geninin ekspresyon düzeyleri analiz edilmiş ve AML patogenezinde etkili diğer parametrelerle karşılaştırılmıştır.

AML kadınlara oranla erkeklerde daha sık görülmektedir (8). Çalışmaya dahil edilen 100 AML olgusundan %45'i (n=45) kadın, %55'i (n=55) erkektir. HLA-B ($p=0,366$), BiP ($p=0,615$) ve XBP1 ($p=0,737$) ekspresyon değerleri ile olguların

cinsiyetleri arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür.

Yenidoğan döneminde de sık görülmesine karşın erişkinlerdeki akut lösemilerin çoğunu (%80) AML oluşturmaktadır. İlerleyen yaşla görülme sıklığında artış olmakla birlikte 65 yaş üstü görülme sıklığı daha fazladır (9, 10). Çalışmamızdaki olguların yaş aralığı 1-85 arasında olup, bunların %12'si (n=12) kız çocuk, %33'ü (n=38) yetişkin kadın, %10'u (n=10) erkek çocuk ve %45'i (n=45) yetişkin erkektir. Çocukluk çağı (0-17 yaş) ve yetişkin (18 yaş ve üstü) AML olguları ile HLA-B ($p=0,215$), BiP ($p=0,143$) ve XBP1 ($p=0,527$) ekspresyon değerlerinin karşılaştırılmasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

Lökosit sayısı AML'nin alt tipine göre artmış, azalmış veya normal düzeyde olabilir (88). Yapılan analizde HLA-B, BiP ve XBP1 ekspresyon değerleri ile lökosit sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon olmadığı gösterilmiştir. (Sırasıyla $p=0,124$; $p=0,280$; $p=0,976$)

Çeşitli HLA-B genlerinin AML patogenezinde rol oynadığı çalışmalarla gösterilmiştir. Türk ve Meksika toplumlarında yapılan ayrı çalışmalarda AML'de birçok HLA-B geninin kontrole göre frekanslarının düşük olduğu gözlemlenmiştir (89, 90). Bizim çalışmamızda, sağlıklı kontrol ve hasta gruplarının HLA-B ($p=0,035$) ekspresyonları arasındaki anlamlı değişim ve hastalarda kontrollere göre HLAB ekspresyonunun düşük olması bu iki çalışmayı doğrular niteliktedir. Yaptığımız başka bir analizde ise AML olguları, t(15;17), t(8;21), inv(16) ve FLT3 pozitif ve negatif grupları HLA-B ekspresyonu açısından karşılaştırıldığına istatistiksel olarak bir değişim gözlenmemiştir. (Sırasıyla $p=0,579$; $p=0,107$; $p=0,839$; $p=0,414$). Aynı zamanda AML'li olgularda yapılan korelasyon analizinde HLA-B ile XBP1 arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=0,133$).

ER şaperon proteini BiP, kanser hücrelerinde aktif bir bileşendir ve farklı türdeki kanserlerde de aşırı ekspresyonu gözlemlenmiştir. BiP'in özellikle kanser sistemlerinde apoptozu, proliferasyonu, invazyonu, inflamasyonu, bağışıklığı düzenlediği ve ayrıca bazı çalışmalar da agresif davranış ve kötü prognozu belirten etkili bir biyobelirteç olduğunu göstermektedir. UPR'ın erken düzenleyicilerinden biri olan BiP, fizyolojik olarak ER'da normal koşullarda ATF6, PERK ve IRE-1'e bağlı olarak bulunur. Hücre ER strese girdiğinde bu yollardan ayrılarak UPR'ı aktiveleştirir.

Ayrıca önemli bir ER şaperon olan BiP, proteinlerin katlanmasını sağlayarak hücreyi ER stresten kurtarmaya çalışır. Bu nedenle BiP ekspresyonun yüksek olması hücrede UPR'in aktif olduğunu göstermektedir (87). Yapılan çalışmada t(15;17) pozitif olgular ve negatif olguların BiP ekspresyonları arasında anlamlı bir korelasyon gözlenmiştir ($p<0,001$) ve buna göre de t(15;17) pozitif olgularda BiP ekspresyonunun t(15;17) negatif olgulara oranla daha fazla olduğu bulunmuştur. t(15;17) pozitif AML olgularında BiP ekspresyonunun yüksek olması AML'de UPR'nin aktif olduğunu göstermektedir. t(8;21), inv(16) ve FLT3 pozitif olgularla negatif olguların BiP ekspresyonları arasında ise anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. (Sırasıyla $p=0,865$; $p=0,770$; $p=0,388$)

UPR'nin IRE-1 yolağında görev alan XBP1'in t(15;17), t(8;21), inv(16), FLT3 pozitif ve negatif olgularda ekspresyonlarının karşılaştırılması sonucunda t(15;17) pozitif olgularla negatif olguların XBP1 ekspresyonları arasında anlamlı bir korelasyon görülmüştür ($p=0,015$). Bu anlamlı korelasyon, t(15;17) pozitif olguların XBP1 ekspresyonlarının t(15;17) negatif olgulara göre daha fazla olması IRE1/XBP1 yolağının AML'de aktif olduğunu göstermiştir. t(15;17) translokasyonuna sahip olgularda XBP1 ve BiP ekspresyonlarının yüksek olması, ayrıca yapılan korelasyon analizinde AML olgularının BiP ile XBP1 ekspresyonları arasında anlamlı pozitif bir korelasyon olduğunun ($r=0,529$; $p<0,001$) belirlenmesiyle desteklenmiştir. t(8;21), inv(16) ve FLT3 pozitif olgularla negatif olguların XBP1 ekspresyonları arasında ise anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür. (Sırasıyla $p=0,815$; $p=0,694$; $p=0,679$) Ayrıca BiP ($p=0,598$) ve XBP1 ($p=0,565$) ekspresyonları, kontrol ve hasta grubu arasında da anlamlı bir farklılık göstermemiştir.

XBP1s varyantı bulunan 15 AML olgusundan 6'sı kadın ve 9'u erkek olmak üzere yaş ortalamaları ise da 40,33'tür. XBP1s varyantı bulunan ve bulunmayan olguların yaş ve lökosit ortalamaları karşılaştırıldığında anlamlı bir sonuç bulunamamıştır ($p=0,882$; $p=0,091$).

Uzun süren ER strete XBP1u, XBP1s'e bağlanıp onun proteozomal degradasyonunu sağlayarak bu yolağın UPR cevabının sonlamasını kontrol eder (69). XBP1s varyantı bulunan olgularla XBP1s varyantı bulunmayan (XBP1u) olguların HLA-B, BiP ve XBP1 ekspresyonları karşılaştırıldığında HLA-B ($p=0,05$) ve BiP ($p=0,186$) ekspresyonlarında anlamlı bir değişim gözlenmezken XBP1s varyantı

bulunan olgularla XBP1u varyantı bulunan olgular arasında ($p=0,003$) anlamlı negatif bir korelasyon gözlemlenmiştir. Bu korelasyon, uzun süren ER stres sonucunda XBP1u'nun fazla ekspresyonu olarak değerlendirilebilir.

Miyeloperoksidaz (MPO) granüllerinin kristalleşip sitoplazmada birikmesiyle oluşan *Auer rod*lar, AML için prognostik bir faktördür (91). XBP1s varyantını bulduğumuz 6 AML olgusunda da MPO seviyelerinde artış görülmüştür. Bu da MPO birikiminin ER stresi tetikletip UPR yolaklarını aktive edebileceğini düşündürmektedir.

Ph + ALL alt kümelerinde, doğrudan BCR-ABL füzyon onkogenini hedef alan imatinib tedavisinin XBP1 ekspresyonunu azalttığı görülmüştür (85). XBP1 gibi UPR genlerinin ekspresyonu, ER strese hücre sağkalımını teşvik ederek multipl miyelomun progresyonunda rol oynar. Multipl Miyelom hücreleri, diğer kanser hücreleri ile karşılaştırıldığında proteazom inhibitör, *bortezomib*in neden olduğu ER strese bağlı apoptoza son derece duyarlıdır. XBP1 daha çok sağ kalımla ilişkili olduğu için, *bortezomib* tedavisine bağlı olarak hücre apoptoza yöneldiğinde XBP1 ekspresyonu da azalır (84). Tedavi öncesi XBP1s varyantı bulunan 2 t(15;17) pozitif ve 1 inv(16) pozitif AML olgularında indüksiyon tedavisi sonrası gelişlerinde hala pozitif olmalarına karşın XBP1s varyantı bulunamamıştır. Bazı anti-kanser ilaçlarının UPR'ı aktive ederek XBP1 kesilmesini indüklediği yapılan çalışmalarla gösterilse de (87), farklı UPR yolakları seçildiği için XBP1 ekspresyonunun azalması da olasıdır (84, 85).

ER stres indüklemeye mekanizmaları, UPR'nin adaptif yanıtını bozarak potansiyel anti-kanser stratejileri oluşturur. UPR cevabını azaltma veya yok etme stratejisi, anti-kanser ajanlarına karşı ilaç direnci problemlerine de çözüm olabilir. Bu nedenle, kanserde UPR'ı hedefleyen terapötik yaklaşımlar ikiye ayrılabilir: ER'da yanlış katlanmış proteinlerin protein katlama gereksinimleri artırılır, böylece daha ağır ER stres hücre ölümüne neden olur veya UPR adaptif ve sağ kalım yolları inhibe edilerek antikanser tedavisine duyarlılığı artırılabilir (87). AML patogenezinde XBP1'in rolünün olması, UPR'ın bu kolunun hedeflenerek AML için yeni tedavi stratejileri oluşturabileceği için önemli bir çalışma alanıdır.

Bu çalışma, AML patogenezinde XBP1 geninin etkisinin araştırıldığı Türkiye'deki ilk çalışmadır. Çalışmamız, UPR'da rol oynayan XBP1s ve BiP genlerinin ekspresyonlarının AML'de kontrollere göre seviyelerinin değiştiğini gösteren veriler sunmuştur. Bu veriler, AML patogenezinin aydınlatılmasında ilerki çalışmalara

öncülük edecektir. AML'nin oluşumunda ve progresyonunda birçok etken rol oynadığından bu yolların aydınlatılması için daha geniş çapta çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



KAYNAKLAR

1. Alicia G Arroyo, Joy T Yang, Helen Rayburn, Richard O Hynes. Differential Requirements for $\alpha 4$ Integrins during Fetal and Adult Hematopoiesis Cell, Volume 85, Issue 7, Pages 997-1008. Pubmed PMID: 8674127.
2. Regina B. *Bone Marrow and Blood Cell Development*. Erişim: 16.10.2017 <https://www.thoughtco.com/bone-marrow-anatomy-373236>
3. Margarita G, and Gueorgui B. (Ed.). (2013). *Leukemia*. InTech Press ISBN:978-953-51-1127-6, 252 pages. DOI: 10.5772/45914
4. Pui, C. H. (Ed.). (2012). *Childhood leukemias*.(3th ed.) New York, USA: Cambridge University Press. ISBN: 978-0-521-19661-1
5. Ali, R. *Akut Lösemiler WHO Sınıflaması ve Nadir Akut Lösemi Tipleri*. BİLİMSEL PROGRAM 5, 7.
6. Kay, A. B. (2015). *The early history of the eosinophil*. Clinical & Experimental Allergy, 45(3), 575-582.
7. Wiernik, P. H. (Ed.). (2003). *Neoplastic diseases of the blood* (No. 439). New York, USA: Cambridge University Press
8. Wiernik, P. H. (Ed.). (2003). *Neoplastic diseases of the blood* (No. 439). New York, USA: Cambridge University Press.
9. Başlar, Z.(2005) *Erişkinlerde Akut Lösemiler*. Hematolog Olmayanlar İçin Hematolojik Maliniteler Sempozyum Dizisi No:45; s.171-180.
10. Anak, S., & Uysalol, E. (2012). *Akut Miyeloid Lösemi (AML)*. Journal of the Child/Çocuk Dergisi, 12(4).
11. Zwaan, C. M., Kolb, E. A., Reinhardt, D., ve ark. (2015). Collaborative efforts driving progress in pediatric acute myeloid leukemia. Journal of clinical oncology, 33(27), 2949.
12. Döhner, H., Weisdorf, D. J., & Bloomfield, C. D. (2015). Acute myeloid leukemia. New England Journal of Medicine, 373(12), 1136-1152.
13. Saultz, J. N., & Garzon, R. (2016). Acute myeloid leukemia: a concise review. Journal of clinical medicine, 5(3), 33.
14. <https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/about/key-statistics.html>
15. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>

16. De Kouchkovsky, I., & Abdul-Hay, M. (2016). Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. *Blood cancer journal*, 6(7), e441.
17. ŞENCAN, M. (2010). *Akut Lösemiler: Epidemiyoloji, Etiyoloji ve Patogenez*. Türkiye Klinikleri Journal of Hematology Special Topics, 3(2), 1-4.
18. Segeren, C., & van't Veer, M. (1996). The FAB classification for acute myeloid leukaemia-is it outdated?. *The Netherlands journal of medicine*, 49(3), 126-131.
19. Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, ve ark. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, blood-2016.
20. Gajendra S. (2016) Flowcytometry in Acute Leukemia. *Clin Oncol*. 1: 1166.
21. Deschler, B., & Lübbert, M. (2006). Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer*, 107(9), 2099-2107.
22. Hamid, G. A. (2013). Acute Leukemia Clinical Presentation. In *Leukemia*. InTech.
23. Asif, N., & Hassan, K. (2013). Acute myeloid leukemia amongst adults. *J Islamabad Med Dental College*, 2, 58-63.
24. Faduola, P., Hakim, A., Mansnerus, J., Imai, A., & Neill, R. O. (2013). Acute myeloid leukaemia-therapy-past, present and future. *Translational Biomedicine*, 4(2).
25. Güneş H,V.(2013). Moleküler Hücre Biyolojisi (3th ed.). *İstanbul Tıp Kitabevi*.
26. Wang, G., Yang, Z. Q., & Zhang, K. (2010). Endoplasmic reticulum stress response in cancer: molecular mechanism and therapeutic potential. *American journal of translational research*, 2(1), 65.
27. Schwarz, D. S., & Blower, M. D. (2016). The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and molecular life sciences*, 73(1), 79-94.
28. Bustin, S. (2015). Molecular Biology of the Cell, Sixth Edition; ISBN: 9780815344643 *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 28123–28125. <http://doi.org/10.3390/ijms161226074>
29. Yoshida, H. (2007). ER stress and diseases. *The FEBS journal*, 274(3), 630-658.
30. <https://ajweinmann.wordpress.com/endoplasmic-reticulum/>
31. Braakman, I., & Hebert, D. N. (2013). Protein folding in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(5), a013201.

32. DÜZGÜN, A., ALAÇAM, H., & OKUYUCU, A. (2012). Endoplazmik retikulum stresi ve katlanmamış protein cevabı. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 29(2).
33. Braakman, I., & Bulleid, N. J. (2011). Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annual review of biochemistry*, 80, 71-99.
34. Bukau, B., Weissman, J., & Horwich, A. (2006). Molecular chaperones and protein quality control. *Cell*, 125(3), 443-451.
35. Lewy, T. G., Grabowski, J. M., & Bloom, M. E. (2017). BiP: Master Regulator of the Unfolded Protein Response and Crucial Factor in Flavivirus Biology . *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 90(2), 291–300.
36. Kania, E., Pająk, B., & Orzechowski, A. (2015). Calcium homeostasis and ER stress in control of autophagy in cancer cells. *BioMed research international*, 2015.
37. Ellgaard, L., & Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature reviews Molecular cell biology*, 4(3), 181.
38. Gupta, G. S. (2012). Lectins in Quality Control: Calnexin and Calreticulin. In *Animal Lectins: Form, Function and Clinical Applications* (pp. 29-56). Springer, Vienna.
39. Hoseki, J., Ushioda, R., & Nagata, K. (2009). Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation. *Journal of biochemistry*, 147(1), 19-25.
40. Ye, Y., Shibata, Y., Yun, C., Ron, D., & Rapoport, T. A. (2004). A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature*, 429(6994), 841.
41. Gupta, G. S. (2012). *Animal lectins: form, function and clinical applications*. Springer Science & Business Media. ISBN 978-3-7091-1064-5. DOI 10.1007/978-3-7091-1065-2.
42. Tamura, T., Cormier, J. H., & Hebert, D. N. (2008). Sweet bays of ERAD. *Trends in biochemical sciences*, 33(7), 298-300.
43. Olzmann, J. A., Kopito, R. R., & Christianson, J. C. (2013). The mammalian endoplasmic reticulum-associated degradation system. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(9), a013185.
44. Lemus, L., & Goder, V. (2014). Regulation of endoplasmic reticulum-associated protein degradation (ERAD) by ubiquitin. *Cells*, 3(3), 824-847.

45. Lipson, C., Alalouf, G., Bajorek, M. ve ark. (2008). A proteasomal ATPase contributes to dislocation of endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) substrates. *Journal of Biological Chemistry*, 283(11), 7166-7175.
46. Cubillos-Ruiz, J. R., Bettigole, S. E., & Glimcher, L. H. (2017). Tumorigenic and immunosuppressive effects of endoplasmic reticulum stress in cancer. *Cell*, 168(4), 692-706.
47. Frakes, A. E., & Dillin, A. (2017). The UPRER: sensor and coordinator of organismal homeostasis. *Molecular cell*, 66(6), 761-771.
48. Rufo, N., Garg, A. D., & Agostinis, P. (2017). The Unfolded Protein Response in Immunogenic Cell Death and Cancer Immunotherapy. *Trends in cancer*, 3(9), 643-658.
49. Chevet, E., Hetz, C., & Samali, A. (2015). Endoplasmic reticulum stress-activated cell reprogramming in oncogenesis. *Cancer discovery*, 5(6), 586-597.
50. <https://www.novusbio.com/support/upr-and-er-stress-faqs>
51. Plate, L., & Wiseman, R. L. (2017). Regulating secretory proteostasis through the unfolded protein response: from function to therapy. *Trends in cell biology*, 27(10), 722-737.
52. Kadowaki, H., & Nishitoh, H. (2013). Signaling pathways from the endoplasmic reticulum and their roles in disease. *Genes*, 4(3), 306-333.
53. Hetz, C., Martinon, F., Rodriguez, D., & Glimcher, L. H. (2011). The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1 α . *Physiological reviews*, 91(4), 1219-1243.
54. Okada, T., Yoshida, H., Akazawa, R., Negishi, M., & Mori, K. (2002). Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochemical Journal*, 366(Pt 2), 585.
55. Ma, J. H., Wang, J. J., & Zhang, S. X. (2014). The unfolded protein response and diabetic retinopathy. *Journal of diabetes research*, 2014.
56. Hetz, C., & Papa, F. R. (2017). The unfolded protein response and cell fate control. *Molecular cell*.
57. Duffee, L. E., Boatwright, J. L., Pacha, F. H. ve ark. (2012). Eukaryotic Endoplasmic Reticulum Stress-Sensing Mechanisms. *Advances in Life Sciences*, 2(6), 148-155.

58. Bettigole, S. E., & Glimcher, L. H. (2015). Endoplasmic reticulum stress in immunity. *Annual review of immunology*, 33, 107-138.
59. Jiang, D., Niwa, M., & Koong, A. C. (2015, August). Targeting the IRE1 α -XBP1 branch of the unfolded protein response in human diseases. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 33, pp. 48-56). Academic Press.
60. Rubio, C., Pincus, D., Korennykh, A. ve ark. (2011). Homeostatic adaptation to endoplasmic reticulum stress depends on Ire1 kinase activity. *The Journal of cell biology*, 193(1), 171-184.
61. Chen, Y., & Brandizzi, F. (2013). IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. *Trends in cell biology*, 23(11), 547-555.
62. Lin, J. H., Li, H., Yasumura, D. ve ark.(2007). IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *science*, 318(5852), 944-949.
63. Maurel, M., Chevet, E., Tavernier, J., & Gerlo, S. (2014). Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends in biochemical sciences*, 39(5), 245-254.
64. Maurel, M., & Chevet, E. (2013). Endoplasmic reticulum stress signaling: the microRNA connection. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 304(12), C1117-C1126.
65. Upton, J. P., Wang, L., Han, D. ve ark.(2012). IRE1 α cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. *Science*, 1226191.
66. Han, D., Lerner, A. G., Walle, L. V. ve ark. (2009). IRE1 α kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell*, 138(3), 562-575.
67. Cretenet, G., Le Clech, M., & Gachon, F. (2010). Circadian clock-coordinated 12 hr period rhythmic activation of the IRE1 α pathway controls lipid metabolism in mouse liver. *Cell metabolism*, 11(1), 47-57.
68. Volmer, R., van der Ploeg, K., & Ron, D. (2013). Membrane lipid saturation activates endoplasmic reticulum unfolded protein response transducers through their transmembrane domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(12), 4628-4633.
69. Wu, R., Zhang, Q. H., Lu, Y. J., ve ark.(2015). Involvement of the IRE1 α -XBP1 pathway and XBP1S-dependent transcriptional reprogramming in metabolic diseases. *DNA and cell biology*, 34(1), 6-18.

70. Liou, H. C., Boothby, M. R., Finn, P. W., ve ark. (1990). A new member of the leucine zipper class of proteins that binds to the HLA DR alpha promoter. *Science*, 247(4950), 1581-1584.
71. Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(2), 89.
72. Navid, F., & Colbert, R. A. (2017). Causes and consequences of endoplasmic reticulum stress in rheumatic disease. *Nature Reviews Rheumatology*, 13(1), 25.
73. Urra, H., Dufey, E., Avril, T., Chevet, E., & Hetz, C. (2016). Endoplasmic reticulum stress and the hallmarks of cancer. *Trends in cancer*, 2(5), 252-262.
74. Glimcher, L. H. (2010). XBP1: the last two decades. *Annals of the rheumatic diseases*, 69(Suppl 1), i67-i71.
75. Binet, F., & Sapieha, P. (2015). ER stress and angiogenesis. *Cell metabolism*, 22(4), 560-575.
76. Acosta-Alvear, D., Zhou, Y., Blais, A., ve ark.(2007). XBP1 controls diverse cell type-and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Molecular cell*, 27(1), 53-66.
77. Bettigole, S. E., Lis, R., Adoro, S., Lee, A. H., ve ark.(2015). The transcription factor XBP1 is selectively required for eosinophil differentiation. *Nature immunology*, 16(8), 829.
78. Zeng, L., Xiao, Q., Chen, M., ve ark.(2013). VEGF-Activated XBP1 Splicing in Endothelial Cells is Crucial for Angiogenesis. *Circulation*, CIRCULATIONAHA-113.
79. Martinon, F., Chen, X., Lee, A. H., & Glimcher, L. H. (2010). TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nature immunology*, 11(5), 411.
80. Margariti, A., Li, H., Chen, T., ve ark.(2013). XBP1 mRNA splicing triggers an autophagic response in endothelial cells through BECLIN-1 transcriptional activation. *Journal of Biological Chemistry*, 288(2), 859-872.
81. Maurel, M., McGrath, E. P., Mnich, ve ark.(2015, August). Controlling the unfolded protein response-mediated life and death decisions in cancer. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 33, pp. 57-66). Academic Press.
82. Ojha, R., & Amaravadi, R. K. (2017). Targeting the unfolded protein response in cancer. *Pharmacological research*, 120, 258-266.

83. Vanacker, H., Vetter, J., Moudombi, L., ve ark.(2017). Emerging role of the unfolded protein response in tumor immunosurveillance. *Trends in cancer*, 3(7), 491-505.
84. Vincenz, L., Jäger, R., O'Dwyer, M., & Samali, A. (2013). Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response: targeting the Achilles heel of multiple myeloma. *Molecular cancer therapeutics*, 12(6), 831-843.
85. Masouleh, B. K., Chevet, E., Panse, J., ve ark.(2015). Drugging the unfolded protein response in acute leukemias. *Journal of hematology & oncology*, 8(1), 87.
86. Schardt, J. A., Weber, D., Eyholzer, M., Mueller, B. U., & Pabst, T. (2009). Activation of the unfolded protein response is associated with favorable prognosis in acute myeloid leukemia. *Clinical cancer research*, 15(11), 3834-3841.
87. Lee, A. S., & Hendershot, L. M. (2006). ER stress and cancer. *Cancer biology & therapy*, 5(7), 721-722.
88. Nguyen, S., Leblanc, T., Fenaux, P.,ve ark. (2002). A white blood cell index as the main prognostic factor in t (8; 21) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 161 cases from the French AML Intergroup. *Blood*, 99(10), 3517-3523.
89. Patiroğlu, T., & Akar, H. H. (2016). The Frequency of HLA-A, HLA-B, and HLA-DRB1 Alleles in Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia in the Turkish Population: A Case-Control Study. *Turkish Journal of Hematology*, 33(4), 339–345.
<http://doi.org/10.4274/tjh.2016.0102>
90. Fernández-Torres, J., Flores-Jiménez, D., Arroyo-Pérez, ve ark.(2013). HLA-B* 40 allele plays a role in the development of acute leukemia in Mexican population: a case-control study. *BioMed research international*, 2013.
91. Zassadowski, F., Ades, L., Schlageter, M. ve ark. (2008). Auer rods and differentiation in acute promyelocytic leukemia. *British journal of haematology*, 142(6), 998-1000.

FORMLAR

GENETİK TANI AMAÇLI BAŞVURAN HASTALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

Burada attığım imza ile genetik testlerimin yapılması, materyalimin saklanması ve gereği halinde kimlik bilgilerim saklı kalmak koşulu ile elde edilen verilerin İ.Ü.AZİZ SANCAR DETAE Genetik AD tarafından organize edilen veya desteklenen bilimsel çalışmalarda kullanılmasını kabul ediyorum ve bu onayı verirken aşağıdaki bilgileri okuduğumu, anladığımı ve kabul ettiğimi de tasdik ediyorum. (Bu belge 1 sayfadan oluşmaktadır)

NOT:

Zihinsel özürlü kişiler, bilinci kapalı olanlar ve reşit olmayan çocuklar için bu belge velisi veya vasisi tarafından doldurulacaktır. Kararınızdan önce aşağıdaki bilgileri lütfen okuyunuz.

Formu Okuyup İmzalayan Kişinin;

Adı ve Soyadı:

Hastaya Yakınlık Derecesi:

İletişim Bilgileri:

Tarih:

İmza:

Bilgilendiren Kişinin;

Adı ve Soyadı:

Tarih:

İmza

1. Kolunuzdan 10 (1 tüp) ml. kan alınması gerekmektedir. Bu kandan, DNA/RNA/ hücre elde edilecektir. Bu aşamada başarısız olduğunda bir kez daha kan vermeniz istenebilir. Kan alma işlemi ile ilgili riskler arasında bayılma, ağrı ve/veya kan alma bölgesinde morarma sayılabilir. Ender durumlarda iğne deliğinin yerinde enfeksiyon ya da küçük bir kan pıhtısı olabilir. Olası bir soruna karşı gerekli tedbirler tarafımızdan alınacaktır.

2.Tanı örneğiniz bölümümüze ulaştıktan sonra kayıt edilip, numaralandırılarak, kişisel bilgileriniz gizli tutulacak şekilde saklanmaktadır. Örneğin tanı amaçlı kullanımını;

Kabul ediyorum ☐

Kabul etmiyorum ☐

3. Alınan biyolojik örneklerden DNA/RNA/hücre materyaliniz izole edilerek saklanacaktır. Oluşturulan bu arşivde kişi isimleri kullanılmayacak, örnekler numaralı olarak korunacaktır.

4. Tanı örneğinizde istenen tetkikler tamamlandıktan ve yasal süre boyunca saklanacak şekilde arşivlenecektir. Tanı amaçlı yapılan analizler raporlandıktan sonra artan materyal hastalıkların genetiğini aydınlatmak ve tedaviye yönelik yeni hedeflerin belirlenmesini amaçlayan ve DETAE’de gerçekleştirilen bilimsel araştırma projelerinde kullanılabilir. Örneğinizin bilimsel çalışmalara dahil edilmesini

Kabul ediyorum ☐

Kabul etmiyorum ☐

5. Çalışma sonucunda tedaviye yönelik bir cevap elde edilmeyebilir. Ancak arzu ederseniz kişisel bulgularınıza ulaşma hakkına sahipsiniz. Örneğimde belirlenen bulguları öğrenmek

İstiyorum ☐

İstemiyorum ☐

6. Elde edilen genetik bilgiler şifre korumalı bir bilgisayar programında korunacaktır. Kişisel ve tıbbi bilgileriniz işyeri, eğitim kurumu ve sigorta şirketi gibi üçüncü şahıslara aktarılmayacaktır.

7. Araştırma sırasında genetik test sonuçlarının sizi ve ailenizi psikolojik veya diğer bir yönden etkileyeceğini düşünmeniz durumunda, araştırmadan isteğiniz üzere ayrılabilirsiniz.

8. Bu çalışmada sizden maddi bir beklentimiz olmadığı gibi size maddi bir katkısı da olmayacaktır.

9. Bu çalışmaya katılmayı reddedebilir ya da herhangi bir aşamada vazgeçebilirsiniz. Bu talebiniz, gelecekteki takip ve tedaviniz üzerine olumsuz etkisi olmayacaktır.

10. Gönüllü rızasına bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma harici bırakılabilirsiniz.

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 1485

Tarih : 15.12.2016

Konu : Doç. Dr. Neslihan ABACI hk.

Sayın Doç. Dr. Neslihan ABACI
Genetik

İlgi: Genetik Anabilim Dalının 28/11/2016 gün ve 428045 sayılı yazı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Nezahat Ece BİBEROĞLU' nun yürüteceği 2016/1422 dosya numaralı "Akut Miyeloid Lösemi hastalarında katlanmamış ya da yanlış katlanmış protein cevabının XBP-1 geni üzerinden etkisinin araştırılması" başlıklı çalışma kurulumuzun 09/12/2016 gün ve 21 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yağz ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar

Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

AKUT MİYELOİD LÖSEMİ HASTALARINDA KATLANMAMIŞ YA
DA YANLIŞ KATLANMIŞ PROTEİN CEVABININ XBP 1 GENİ
ÜZERİNDEN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

%**7**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**4**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**3**

YAYINLAR

%**5**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Nezahat Ece	Soyadı	Biberoğlu
Doğ.Yeri	Rize	Doğ.Tar.	07/11/1990
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	55111460700
Email	ece@biberoglu.com	Tel	05448525382

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2018
Lisans	Yıldız Teknik Üniversitesi	2014
Lise	Rize Fen Lisesi	2008

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	Çok iyi		

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	81,24	79,2	65,2

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi
Genetik veri tabanları(NCBI, Ensembl)	Çok iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

1.Ulusal Bilimsel toplantılarda sunulan bildiri kitabında basılan bildiriler

Emrence, Z., Sarıman,M., Çınar, S., Salman, B., **Biberoğlu, N.E.**, Abacı, N., Sırma Ekmekci, S., *The Role of NOL7 Gene in All Trans Retinoic Acid Resistance of Acute Myeloid Leukemia Cells.*, May 27-30 ESHG 2017, Copenhagen-Denmark.

