

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

**MULTİPL MİYELOM HÜCRELERİNDE CLPP
İNİHİBSİYONUNUN İNTEGRİN SİNYALİZASYONU
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

GAMZE BOZKAYA

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi DİLARA AKÇORA YILDIZ

BURDUR, 2023

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “**Multipl Miyelom Hücrelerinde CLpP İnhibisyonunun İntegrin Sinyalizasyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması**” başlıklı bu tezin;

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

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

.... / / 2023

Gamze BOZKAYA

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan değerli Danışman Hocam Dr. Öğr. Üyesi DİLARA AKÇORA YILDIZ'a teşekkürlerimi sunarım.

CLpP'nin inhibisyonu çalışmalarında yardımlarından dolayı Denizli Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Genetik Laboratuvarı ekibine ve Doç. Dr. Onur TOKGÜN'e, teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Uzm. Orhan YAVUZ'a ve Uzm. Ali Kıyak'a teşekkür ederim.

Araştırmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm laboratuvar arkadaşlarım Çağlar ARKAN, Nagehan GÜL ve Yakuphan BAYKAN'a teşekkür ederim.

0683-YL-20 No`lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasındaki CLpP'nin inhibisyonu çalışmaları 118Z535 nolu TÜBİTAK projesi tarafından desteklenmiştir.

Eğitim hayatımın her aşamasında beni her anlamda destekleyen aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Mayıs, 2023

Gamze BOZKAYA

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL DİZİNİ.....	iv
ÇİZELGE DİZİNİ	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ÖZET.....	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ.....	10
2. GENEL BİLGİLER	13
2.1. Multipl Miyelom (MM)	13
2.1.1. MM Tedavisi.....	13
2.2. MM Metabolizması.....	14
2.2.1. Mitokondriyal kalite kontrolün sağlanması	15
2.2.2. Mitokondriyal katlanmamış protein yanıtı (UPR ^{mt})	16
2.3. Mitokondriyal Proteaz Sistemi	18
2.4. Kazeinolitik Proteaz P (CLpP)	19
2.5. İntegrinler.....	20
2.5.1. VLA-4	21
2.5.2. VLA-5	21
2.5.3. İntegrin-β7.....	21
2.6. Kısa Saç Tokası RNA'lar (Short Hairpin RNA'lar, shRNA).....	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	24
3.1. Materyal	24
3.1.1. Multiple Miyelom (MM) Hücre hatları	24
3.1.2. Aletler ve Cihazlar	24
3.2. Yöntem.....	24
3.2.1. Lentiviral Paketleme ve shRNA Plazmidlerinin Temini ve Çoğaltılması	24
3.2.2. Bakteri Hücrelerinin Aynı Solüsyonda Dönüştürülmesi ve Saklanması (TSS).....	25
3.2.3. Plazmid İzolasyonu	26
3.2.4. Lentivirüs Üretimi.....	27
3.2.5. Hücre Kültürü Çalışmaları	27
3.2.6. Enfeksiyon.....	28
3.2.7. Pozitif Klonların Seçilimi	28
3.2.8. Protein İzolasyonu ve Kantitasyonu	28
3.2.9. Western Blotlama Yöntemi.....	28
3.2.10. RNA İzolasyonu.....	29
3.2.11. DNaz Muamelesi ve cDNA Sentezi.....	30
3.2.11.1. DNaz Muamelesi.....	30
3.2.11.2. cDNA Sentezi.....	30
3.2.12. Eş-Zamanlı Kantitatif PCR (qPCR).....	31
3.2.13. İstatiksel Analiz.....	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	33
4.1. Araştırma Bulguları	33
4.1.1. MM Hücrelerinde CLpP İfadesinin İnhibisyonu	33

4.1.2. Lentiviral shRNA İnfeksiyonu Sonrası MM Hücrelerinde CLpP mRNA Ekspresyon Değişimi	34
4.1.3. MM Hücrelerinde CLpP İfadesinin İnhibisyonunun Protein Seviyede Teyidi	35
4.1.4. MM hücrelerinde CLpP İnhibisyonunun İntegrin mRNA Ekspresyonları Üzerine Etkisi.....	36
4.1.4.1. VLA4 mRNA ekspresyon değişimi.....	36
4.1.4.2. VLA5 mRNA ekspresyon değişimi.....	37
4.1.4.3. İntegrin- β 7 mRNA ekspresyon değişimi.....	38
4.2. Tartışma	39
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	43
KAYNAKLAR.....	44



ŞEKİL DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Memeli hücrelerinde mitokondriyal füzyon (A) ve füzyonun (B) şematik gösterimi.	16
Şekil 2.2. Bir hücre yüzey protein reseptörü olan integrinin temel yapısı.	20
Şekil 3.1. Kloromfenikol içeren LB agar besiyerinde büyümüş ilgili shRNA plazmidini içeren STBL3 kolonileri.	26
Şekil 4.1. CLpP shpool lentivirüslerinin MM hücrelerine infeksiyonu.	33
Şekil 4.2. CLpP shkontrol lentivirüslerinin MM hücrelerine infeksiyonu.	34
Şekil 4.3. Lentiviral shRNA uygulaması sonrası NCI H929 ve RPMI 8226 MM hücrelerinde CLpP mRNA ekspresyon değişimi (n=3).	35
Şekil 4.4. CLpP inhibisyonu sonrası NCI H929 hücresinde CLpP protein ifadesi (p<0,0001) (n=3).	35
Şekil 4.5. CLpP inhibisyonu sonrası RPMI 8226 hücresinde CLpP protein ifadesi (p<0,0001) (n=3).	36
Şekil 4.6. Lentiviral shRNA aracılı NCI H929 ve RPMI 8226 hücrelerinde CLpP inhibisyonun VLA4 mRNA ekspresyon düzeyinin değişimi	37
Şekil 4.7. Lentiviral shRNA aracılı NCI H929 RPMI 8226 hücrelerinde CLpP inhibisyonun VLA5 mRNA ekspresyon düzeyinin değişimi	38
Şekil 4.8. Lentiviral shRNA aracılı NCI H929 ve RPMI 8226 hücrelerinde CLpP inhibisyonun ITG7 mRNA ekspresyon düzeyinin değişimi.	39

ÇİZELGE DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. İzole edilen plazmidlerin yoğunlukları	26
Çizelge 3.2. DNaz Muamelesi.....	30
Çizelge 3.3. DNaz PCR koşulları.....	30
Çizelge 3.4. BioRad iScript cDNA sentez kiti bileşenleri	31
Çizelge 3.5. BioRad iScript PCR basamakları.....	31
Çizelge 3.6. Bu çalışmada kullanılan primerlerin sekansları.	31



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATP	: Adenozin Trifosfat
CAM-DR	: Hücre Adezyon Aracılı İlaç Direnci
CLpP	: Kazeinolitik Proteaz Proteolitik P
ClpXP	: Kazeinolitik Peptidaz XP
CRAB	: Multipl miyelom tanı kriterleri
Drp1	: dinamin ile ilişkili protein
ECM	: ekstrasellüler matriks
FADH	: flavin adenin dinükleotidi
GFP	: yeşil floresan protein
GLUT4	: Glukoz taşıyıcı tip 4
GTP	: Guanozin trifosfat
IMiD	: immünomodülatör ilaç
IMWG	: Uluslararası Miyelom Çalışma Grubu
MFN1	: mitofusin 1
MFN2	: mitofusin 2
Drp1	: dinamin ile ilişkili protein
MGUS	: önemi belirsiz monoklonal gamopati
MiD49	: mitokondriyal dinamik proteinler 49
MiD51	: mitokondriyal dinamik proteinler 51
MM	: Multipl miyelom
mtROS	: mitokondriyal reaktif oksijen türleri
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotit
nDNA	: nükleer genom
OPA1	: optik atrofi 1
OXPHOS	: oksidatif fosforilasyon
PI	: proteazom inhibitörü
PINK1	: serin/treonin-protein kinaz 1
qPCR	: kantitatif eş-zamanlı PCR
RNAi	: RNA interferans
ROS	: reaktif oksijen türleri

RRMM	: relaps/refrakter Multipl miyelom
shRNA	: Kısa Saç Tokası RNA
SIRT3	: Sirtuin3
SMM	: Sinsi Sessiz Multipl Miyelom
TCA	: trikarboksilik asit
UPR^{mt}	: mitokondriyal katlanmamış protein yanıtı
VEGF	: vasküler endotelyal büyüme faktörü



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Multipl Miyelom Hücrelerinde CLpP İnhibisyonunun İntegrin Sinyalizasyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Gamze BOZKAYA

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi DİLARA AKÇORA YILDIZ

Mayıs, 2023

Multipl miyelom (MM), kemik iliğinde monoklonal antikör üreten plazma hücrelerinin aşırı proliferasyonu sonucu oluşan kan kanseridir. Mevcut tüm tedaviler küratif potansiyele sahip olmadığından ve hastaların çoğunluğunda nüks oluştuğundan MM tedavi edilemez bir malignite olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, MM biyolojisinin altında yatan moleküler mekanizmaların iyi anlaşılmasına gerek vardır.

MM hücreleri çoğalabilmek ve monoklonal antikör üretebilmek için mitokondriyal fonksiyonlarının sürdürülmesine ihtiyaç duymaktadır. Ancak, mitokondriyal hipoksi, reaktif oksijen türleri (ROS) ve artmış protein homeostazına maruz kalması ile oluşan stres sonucunda fonksiyonları bozulabilir. Mitokondriyal homeostazın korunmasında rol oynayan mekanizmalardan biri olan mitokondriyal katlanmamış protein yanıtı (UPR^{mt})’nda görevli kazeinolitik proteaz proteolitik alt birim (CLpP) mitoproteazı, oksitlenmiş proteinleri elimine ederek ve yanlış dizilmiş veya katlanmamış polipeptitleri parçalayarak mitokondride kalite kontrol gözetimini sağlar. Ayrıca, MM hücre adezyonunu, göçünü, homingini, invazyonunu ve kemo-direncin düzenlenmesinde VLA-4 ($\alpha 4 \beta 1$), VLA-5 ($\alpha 5 \beta 1$) ve integrin $\beta 7$ integrinlerinin rol oynadıkları gösterilmiştir. Ancak, MM hücrelerinde CLpP’nin VLA-4 ve VLA-5 integrinleri üzerine olan etkisi bilinmediğinden, bu tez çalışmada CLpP’nin VLA-4 ve VLA-5 integrinleri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda çalışmamızda insan MM hücre hatları NCI H929 ve RPMI 8226’da CLpP’nin inhibisyonu shRNA lentivirüs yöntemi ile gerçekleştirilmiş ve bu inhibisyonun integrin ailesinden VLA4 ve VLA-5’in mRNA ifadeleri üzerindeki etkisi kantitatif eş-zamanlı PCR (qPCR) ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, MM hücrelerinde kontrol hücrelere kıyasla CLpP inhibisyonunun sağlandığı hücrelerde VLA4, VLA-5 integrin $\beta 7$ ’nin mRNA ekspresyonundaki önemli azalışlara yol açtığını göstermiştir. Sonuç olarak, CLpP’nin MM hücrelerinde VLA4 ve VLA-5 ifadelerini uyardığı anlaşılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: multipl miyelom, mitokondri, UPR^{mt}, CLpP, integrin

Hazırlanan bu Yüksek Lisans urdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0683-YL-20 proje numarası ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

Investigation of the Effect of CLpP Inhibition on Integrin Signaling in Multiple Myeloma Cells

Gamze BOZKAYA

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

Supervisor: Assist. Prof. DİLARA AKÇORA YILDIZ

May, 2023

Multiple myeloma (MM) is a hematological malignancy characterized by the excessive proliferation of plasma cells producing monoclonal antibodies in the bone marrow. As current treatments do not have curative potential and most patients experience relapse, MM is considered an incurable malignancy. Therefore, a good understanding of the molecular mechanisms underlying MM biology is essential.

MM cells require the maintenance of mitochondrial functions to proliferate and produce monoclonal antibodies. However, exposure to mitochondrial stressors, such as hypoxia, reactive oxygen species (ROS) and increased protein homeostasis, can lead to mitochondrial dysfunction. The mitochondrial unfolded protein response (UPR_{mt}), which plays a role in maintaining mitochondrial homeostasis, involves the kazeinolitik protease proteolytic subunit (CLpP) mitoprotease, which eliminates oxidized proteins and degrades misfolded or unfolded polypeptides to ensure quality control surveillance of the mitochondria. Additionally, the role of VLA-4 ($\alpha 4 \beta 1$), VLA-5 ($\alpha 5 \beta 1$) and integrin $\beta 7$ integrins has been shown in regulating MM cell adhesion, migration, homing, invasion and chemoresistance. However, the effect of CLpP on VLA-4 and VLA-5 integrins in MM cells is unknown.

Therefore, the aim of this study was to investigate the relationship between CLpP and VLA-4 and VLA-5 integrins. In our study, the inhibition of CLpP was achieved using shRNA lentiviral vectors in human MM cell lines NCI H929 and RPMI 8226. The effect of this inhibition on mRNA expression levels of VLA-4, VLA-5 and integrin $\beta 7$ from the integrin family was determined by quantitative simultaneous PCR (qPCR). The results revealed that the inhibition of CLpP in MM cells led to a significant decrease in mRNA expression levels of VLA-4 and VLA-5 compared to control cells. Therefore, it is concluded that CLpP stimulates the expression of VLA-4, VLA-5 and integrin $\beta 7$ integrins in MM cells.

Keywords: multiple myeloma, mitochondria, UPR_{mt}, CLpP, integrin

The present M.Sc. Thesis was supported by Burdur Mehmet Akif Ersoy University Scientific Research Projects Coordinatorship Under the Project number of 0683-YL-20.

1. GİRİŞ

Multipl miyelom (MM), kemik iliğinde plazma hücrelerinin anormal proliferasyonu sonucu oluşan, en yaygın ikinci hematolojik malignitedir (Tanenbaum vd., 2023). Bu malignite, miyelom hücreleri tarafından salgılanan monoklonal antikor olarak bilinen monoklonal immünoglobulin (Ig) veya M-proteinlerinin kan ve/veya idrarda tespiti ile karakterize edilir. Üretilen bu aşırı ve işlevsiz M proteini uç organ hasarının CRAB olarak bilinen karakteristik klinik belirtilerine yol açar. CRAB, hiperkalsemi (C), böbrek yetmezliği (R), anemi (A) ve osteolitik kemik yıkımı (B) semptomlarından oluşmaktadır (Neumeister vd., 2022). CRAB gelişimine doğrudan veya dolaylı olarak yol açan aşırı M protein üretiminden dolayı, MM hücreleri yüksek seviyelerde proteazom aktivitesine sahiptir. Bu nedenle, birinci nesil proteazom inhibitörü (PI) bortezomibin tedavi rejimlerine dâhil edilmesi, MM hastalarının sağ-kalımını önemli ölçüde iyileştirmiştir. Bununla birlikte, çoğu hastada bortezomib direnci gelişmekte ve ardından MM'da önde gelen ölüm nedenlerinden relaps/refrakter durum oluşmaktadır. Edinilmiş bortezomib direncinin üstesinden gelmek için ikinci nesil PI olan carfilzomib ve ixazomib, relaps/refrakter MM (RRMM)'u tedavi etmek için onaylanmıştır (X. Zhang vd., 2023). Bununla birlikte, carfilzomib direncinin kazanılması, MM tedavisinde bir engel haline gelmiştir ve bu, RRMM'li hastaların tedavisi için yeni terapötik seçeneklerin hâlâ gerekli olduğunu göstermektedir. Nitekim yakın zamanda CAR-T hücre stratejisinin RRMM hastaların tedavisinde klinik uygulamaya geçilmesi, MM tedavisi için umut vaat etmektedir. Ancak, MM tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlara karşı kaçınılmaz direnç gelişimi nedeniyle şu anda MM tedavi edilemez olarak kabul edilmekte ve bu nedenle MM'da maligniteyi yönlendiren moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına gerek duyulmaktadır.

MM hücre canlılığının sürdürülmesi ve PI'ne karşı direnç gelişiminde mitokondri önemli bir rol oynamaktadır (Song vd., 2013); (Zheng vd., 2018). Mitokondri, hücrede enerji talebini karşılamak için oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) ve trikarboksilik asit (TCA) döngüsü yoluyla büyük miktarlarda adenosin trifosfat (ATP) ve ara metabolitler üretir. Biyoenerjik ve biyosentetik rollerine ek olarak, mitokondri ayrıca hücresel sinyalizasyonda, kalsiyum homeostazının sürdürülmesinde, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminde ve apoptozda rol oynamaktadır (Fischer vd., 2012). İşlevsel bir mitokondri hücre sağlığının korunmasında önemli iken, mitokondriyal yetmezlik ya da işlev kaybı kalıtsal metabolizma

bozuklukları ve yaşlanmayı da içine alan çeşitli patolojilerle ilişkilidir. İlâveten, mitokondri, apoptotik veya nekrotik hücre ölümünün merkezi uygulayıcısı olarak hareket ettiğinden, hücre ölümünü önlemek için mitokondriyal kalite iyi kontrol edilmelidir. Mitokondriler, homeostazlarını korumak için birçok mekanizma geliştirmiştir. Birincisi, mitokondrilerin kendi proteolitik sistemleri mevcuttur ve bu onların mitokondriyal fonksiyonu potansiyel olarak bozabilecek yanlış katlanmış proteinleri parçalamalarına izin verir. İkincisi, hasarlı dış mitokondriyal membran proteinleri proteazom tarafından parçalanabilir. Üçüncüsü, mitokondri, mitokondrinin hasarlı bileşenlerini onarmak için sürekli fisyon ve füzyona uğrayabilir; bu, fisyon işlemi yoluyla hasarlı mitokondrilerin ayrılmasına ve füzyon işlemi yoluyla sağlıklı mitokondriler arasında materyal alışverişine izin verir. Dördüncüsü, mitokondrinin bir kısmı tomurcuklanıp oksidatif stres koşulları altında mitokondri kaynaklı veziküller (MDV) oluşturabilir, bunlar MDV içindeki oksitlenmiş mitokondriyal proteinleri parçalamak için lizozomlarla daha fazla birleşir. Beşincisi, hasarlı mitokondri, mitokondriyal sferoidler oluşturabilir ve muhtemelen hasarlı mitokondrinin çıkarılması için alternatif bir yol olarak hizmet edecek lizozomal belirteçler edinebilir. Son olarak, hasarlı mitokondri, mitofaji yoluyla lizozomdaki bozulmalarını tetiklemek için otofagozomlar tarafından sarılabilir (Ni vd., 2015; X. Zhang vd., 2023).

Bu sistemler arasında yer alan mitokondriyal katlanmamış protein yanıtı (UPR^{mt}), hücrelerin mitokondriyal işlev bozukluğu sırasında mitokondriyal protein homeostazını koruduğu bir mekanizma olarak tanımlanan adaptif bir transkripsiyonel yanıttır. UPR^{mt} mitokondriyal matrikste katlanmamış proteinlerin birikmesi dâhil olmak üzere çeşitli mitokondriyal stres faktörlerine yanıt olarak aktive edilir (T. Wang vd., 2018). Memeli hücrelerinde UPR^{mt}'nin önemli düzenleyicileri ATF4, CHOP, HSP60, HSP10, kazeinolitik proteaz proteolitik alt birim (CLpP), LON peptidaz 1, (Lonp1), JNK2, c-Jun, C/EBP proteini, Sirtuin3 (SIRT3) ve ATF5 olduğu bulunmuştur (Gu vd., 2021). UPR^{mt}'a katılan şaperon ve proteazlardan kazeinolitik proteaz veya peptidaz P (CLpP), mitokondriyal matrikste yer alan proteolitik aktiviteye sahip ATP bağımlı bir serin proteazdır (Nouri vd., 2020). Normal mitokondriyal fonksiyonun gerçekleşmesinde protein kalitesini sağlamak üzere esasen yanlış katlanmış ve/veya hasar görmüş proteinlerin degradasyonunu katalize eder. OXPHOS ve TCA döngüsündeki proteinler, özellikle CLpP'nin substratlarıdır. CLpP'nin inhibisyonu veya hiperaktivasyonu, mitokondriyal biyoenerjetik ve biyosentetik metabolizmanın bozulmasına yol açmaktadır. CLpP aşırı ekspresyonu, hematolojik maligniteler dâhil olmak üzere çeşitli kanserlerde gözlemlenmiştir (Nouri vd., 2020).

Bununla birlikte, CLpP mitoproteazının MM hücrelerinde oynadığı önemli roller tam olarak aydınlatılamamıştır.

Mitokondriyal fonksiyondaki değişiklikler, kanser hücrelerinin hızla çoğalmasına ve metastaz yapmasına izin verir. Mitokondriyal fonksiyonun yerine getirilmesinde integrinler, Rho GTPazlara bağımlı bir mekanizma ile sinyal iletiminde görev yaparlar (Werner ve Werb, 2002). MM hücreleri, kemik iliği mikroçevresinde ekstrasellüler matriks (ECM) proteinlerine veya kemik iliği stromal hücrelerine yapışır. Bu hücrelerle etkileşimlerde integrinler ve sindekan-1/CD138, immünoglobulin süper ailesi, hücresel adezyon molekülleri ve düzenleyicileri vardır. İntegrinler, MM hücreleri de dâhil olmak üzere, birçok hücre tipi tarafından eksprese edilen geniş bir heterodimerik membran glikoprotein ailesidir. Hücre dışı madde ile hücre-hücre adezyon molekülleri arasındaki etkileşime aracılık eden birincil reseptörler olarak işlev görürler. $\beta 1$ integrin ve özellikle Çok Geç Görünen Antijen ($\alpha 4 \beta 1$, VLA-4, CD49d) ve VLA-5 ($\alpha 4 \beta 7$, CD49e) gibi çok geç antijenler, MM hücre hatlarında ve hastadan türetilen miyelom hücrelerinde ifade edilmektedirler. Özellikle bu integrinlerin, MM hücre adezyonunu, göçünü, homingini, invazyonunu ve ayrıca ilaç direncini düzenlemede rol oynadıkları bilinmektedir (Hosen, 2020). Ayrıca MM hücrelerinde varlığı saptanan ve Proto-onkogen c-Maf veya V-maf (MAF) gen aktivasyonu ile ilişkili olduğu bilinen integrin- $\beta 7$ 'nin MM hücre yapışması, göçü, istilası, BM homingi ve ilaç direncinde kritik bir rol oynadığını gösterilmiştir (Neri vd., 2011).

MM tedavisinde oksidatif stresi indükleyen kemoterapötik ajanların kullanımı ve mitokondride OXPHOS nedeniyle ROS'daki artışın mitokondriyal homeostaza zarar vermesini engelleyen mekanizmalardan UPR^{mt}'de görev yapan CLpP'nin integrin ifadesi ve sinyalizasyonu üzerine olan etkisi tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamızda insan MM hücre hatları NCI H929 ve RPMI 8226'da CLpP'nin inhibisyonu shRNA lentivirüs yöntemi ile gerçekleştirilmiş ve bu inhibisyonun integrin ailesinden VLA4, VLA-5 ve integrin- $\beta 7$ 'nin mRNA ifadeleri üzerindeki etkisi kantitatif eş-zamanlı PCR (qPCR) ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, MM hücrelerinde CLpP inhibisyonunun VLA4, VLA-5 ve integrin- $\beta 7$ 'nin mRNA ekspresyonundaki önemli azalışlara yol açtığını ve CLpP'nin VLA4, VLA-5 ve integrin- $\beta 7$ 'nin ifadelerini uyardığını göstermektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Multipl Miyelom (MM)

Multipl miyelom (MM), neoplastik plazma hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasının neden olduğu tedavi edilemez bir hematopoetik malignitedir. Her yıl dünya çapında yaklaşık 140.000 yeni tanısı konmuş hasta bulunmaktadır. Bu nedenle lösemiden sonra en sık görülen kan kanseridir (Wallington-Beddoe ve Mynott, 2021). Multipl miyelomun, kadınlara nazaran erkeklerde görülme sıklığı daha yüksektir. Hastaların ortalama tanı yaşının 65 yaş civarında olduğu bilinmektedir (Rajkumar, 2022). MM, kemik iliğinde (Kİ) malign plazma hücrelerinin klonal proliferasyonu, litik kemik lezyonları, kanda veya idrarda monoklonal protein ile ilişkili immün yetmezlik ile karakterize edilmiştir (Mimura vd., 2015).

MM, önce premalign bir durum olan önemi belirsiz monoklonal gamopati (MGUS)'den gelişmektedir (Rajkumar, 2016). MGUS, için için yanan multipl miyelom (SMM) olarak bilinen başka bir asemptomatik, ancak daha ileri premalign aşamaya ilerleyebilmektedir. SMM, MM'ye ilerleme açısından çok daha yüksek bir risk ile MGUS'tan ayrılmaktadır (Ho vd., 2020). Uluslararası Miyelom Çalışma Grubu (IMWG) MM tanı kriterlerini revize etmeden önce SMM, idrarda ≥ 500 mg ve ≥ 10 serumda monoklonal protein varlığı ile tanımlanmıştır. Herhangi bir CRAB semptomu (hiperkalsemi, böbrek yetmezliği, anemi veya litik kemik lezyonları) olmayan kemik iliği plazma hücreleridir. SMM, tanıyı takip eden ilk 5 yılda MM'ye ilerleme riski yılda %10, sonraki 5 yılda yılda %3'e ve tanıdan 10 yıl sonra yılda %1'e düşen bir hastalıktır (Ho vd., 2020). MM hücreleri tarafından aşırı üretilen fonksiyonel olmayan monoklonal proteinler (immünoglobulin G [IgG], IgM veya IgA veya nadiren IgE veya IgD veya hafif zincir proteindir (kappa veya lambda)), organ hasarına neden olmaktadır. Hastalığın klinik belirtileri, hiperkalsemi, böbrek yetmezliği, anemi ve/veya litik lezyonlu kemik hastalığı gibi son organ hasarı belirtilerini (CRAB olarak sınıflandırılan organ hasarı gibi belirgin klinik semptomlar) veya patolojik kırıkları içermektedir (Rajkumar vd., 2014). MM'nın teşhisi için birden fazla crab semptomlarının bulunması gerekmektedir (Michels ve Petersen, 2017).

2.1.1. MM Tedavisi

MM tedavisinde son yirmi yılda “tanısal ve terapötik bir devrim” meydana gelmesine rağmen, MM mevcut literatürde hâlâ tedavisi olmayan bir hastalık olarak kabul edilmektedir (Gozzetti ve Bocchia, 2022). Özellikle, proteazom inhibitörü bortezomib ile carfilzomib ve

immünomodülatör ilaçlardan (IMiD'ler) talidomid, lenalidomid ve pomalidomid gibi yeni tedavilerin uygulanması, MM hastalarının genel sağkalımının iyileşmesine neden olmaktadır. (Das vd., 2022). Bu ilaçlar ayrıca immünosupresif bir ilaç olan deksametazon ile birleştirilebilmektedir. Genel sağkalımdaki bu gelişmelere rağmen, MM'lu hastalar sonunda nüks etmektedir. Nüksün ana nedeni ilaç direncinin oluşmasıdır. Mevcut tedavilerdeki gelişmelere rağmen, MM'lu hastalar halâ belirli bir tedavi direnci aşamasına kadar ilerleyebilmektedirler. Kemodirencin, ilacın dışarı pompalanması, apoptozun inhibisyonu, ilaç inaktivasyonu, ilaca bağlı DNA hasarı onarımı ve epigenetik etkilerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Maes ve Menu, 2018).

2.2. MM Metabolizması

Mitokondri, memeli hücrelerinde oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) işlemiyle hücre enerjisinin yaklaşık %90'nı adenosin trifosfat (ATP) formunda üreten çift zarlı bir organeldir (Yan vd., 2019). Bir memeli hücresindeki diğer organellerin aksine, mitokondri, mitokondriyal solunum için bir dizi önemli proteini kodlayan mitokondriyal DNA (mtDNA)'a sahiptir. Mitokondriyal biyokütle ve fonksiyon artışına yol açan biyoenerjideki değişikliklerin, MM dâhil hematolojik malignitelerde ilaç direncine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Barbato vd., 2020). Tekrarlayan ve dirençli MM hastalarında, MM ilerlemesi ile ilişkili olan artmış mitokondriyal biyogenezin etkisi bulunmaktadır (Zhan vd., 2017). Glukoz taşıma (GLUT4) inhibitörlerinin geliştirilmesi dâhil olmak üzere MM'daki metabolik güvenlik açıklarını hedeflemenin terapötik yeteneğini ve MM'da glukoz ve glutamin metabolizmasını hedefleyen kombine tedavilerin avantajları olduğu bilinmektedir. Ayrıca, ritonavir ile glukoz yoksunluğunda veya GLUT4 inhibisyonunda hayatta kalan MM hücrelerinin alt kümesinde artan mitokondriyal OXPHOS'u hedeflemenin etkili olacağı söz konusudur. Bu yüzden MM'da ilaç direncinin üstesinden gelmede mitokondrinin kritik etkisi öne sürülmektedir (Nair vd., 2022). OXPHOS metabolik yolu, elektronların mitokondriyal iç zarda elektron taşıma zinciri (ETC) olarak bilinen bir dizi transmembran protein kompleksine taşınmasıyla ATP üretir. NADH, FADH₂ ve süksinat elektron vericisi olarak görev yapar. Elektronlar multiprotein ETC kompleksleri I ila IV'ten geçerken, protonlar mitokondriyal matriksten kompleksler I, III ve IV tarafından zarlar arası boşluğa pompalanır. OXPHOS aktif olduğunda, zar boyunca yüksek bir proton gradyanı vardır ve protonlar, iç zarlar arası boşluktan mitokondriyal matrikse, kompleks V, ATP sentaz yoluyla ATP sentezini yönlendirerek geri akmaktadır. Oksijen, terminal elektron alıcısı olarak işlev görmektedir (Ashton vd., 2018).

Kanser hücreleri kontrolsüz çoğaldıkça, bu hücreler temel destek sistemleri tarafından korunmayı gerektiren bir dizi güvenlik açığı geliştirmektedir. Özellikle mitokondri, kanserin çeşitli evrelerinde büyümeye ve hayatta kalmaya katkıda bulunmaktadır. Bununla birlikte, mitokondri aynı zamanda, aşırı seviyelerde mitokondriyal reaktif oksijen türleri (mtROS) üreten genetik değişikliklere uğramaktadır. Fizyolojik koşullar altında ve hastalığın erken evrelerinde mitokondri, hücrel büyüme ve hayatta kalma için faydalı olan orta düzeyde mtROS üretmektedir. Aynı zamanda mitokondriyal fonksiyon bozukluğu kötüleştikçe, mtROS seviyeleri tolere edilebilir eşiği aşabilir ve tümör hücreleri için öldürücü hale gelebilmektedir. mtROS, mitokondriyal proteinlerin açılmasını ve toplanmasını teşvik ederek mitokondriyi giderek daha kırılabilir ve işlevsiz bir durumda bırakabilmektedir (Inigo ve Chandra, 2022).

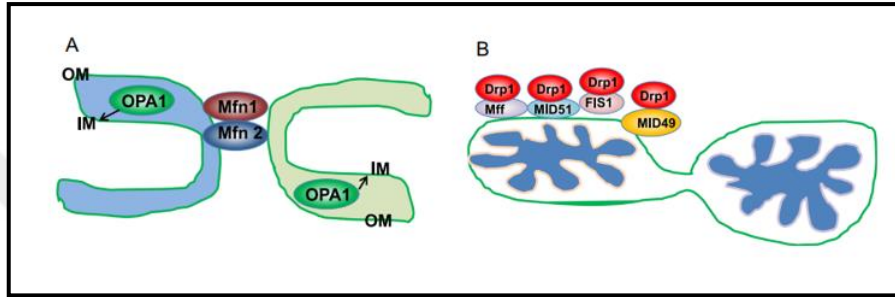
2.2.1. Mitokondriyal kalite kontrolün sağlanması

Mitokondriyal fonksiyonun devamlılığının sağlanmasında ve mitokondri kalitesini korumak için, çeşitli sistemler gelişmiştir. Bu sistemler antioksidanlar, DNA tamir sistemleri, mitokondriyal katlanmamış protein yanıtına (UPR^{mt}) katılan şaperon ve proteazlar, mitofaji ve fizyon/füzyon mekanizmalarıdır ve bu sistemler bir orkestra şeklinde mitokondriyal bütünlüğü kontrol ederler (Ni vd., 2015).

Mitokondri, morfolojisini hücrel gereksinimlere göre uyarlayabilen dinamik organeldir. Bu değişiklikler, fisyon ve füzyonu kapsar. Çalışmalar, yüksek veya uzun süreli bir stres durumunda mitokondrilerin fisyonu uğradığını, hafif veya düşük bir stres durumunda ise mitokondrilerin füzyonu tercih ettiğini göstermektedir. Ayrıca araştırmalar, mitokondrilerin stresin doğasına bağlı olarak, örneğin açlık stresinin füzyonu indüklediği, düşük glikoz ve ETC inhibisyonunun fisyonu uyararak mitokondrilerin morfolojilerini değiştirebileceğini göstermiştir (Roca-Portoles ve Tait, 2021). İlaveten, füzyon mtDNA bütünlüğünün, mitokondriyal solunumun, mitokondriyal membran potansiyelinin, apoptozun ve kalsiyum sinyalinin korunmasında rol aldığı, fisyonun ise oksidatif hasarı önlemek ve hasarlı mitokondrilerin degradasyonunu sağlamak için önemli olduğu gösterilmiştir (Roca-Portoles ve Tait, 2021). İki mitokondrinin birleşerek tek bir mitokondriye dönüştüğü süreç, mitokondriyal füzyon olarak bilinir. Çift zar nedeniyle, mitokondriyal füzyon hem dış hem de iç zar füzyonunu içerir. Üç büyük dinaminle ilişkili GTP hidrolize edici enzim (GTPaz), mitofusin 1 (MFN1), mitofusin 2 (MFN2) ve optik atrofi 1 (OPA1), füzyon işlemine dâhil olur. Özellikle MFN1 ve MFN2, dış mitokondriyal

zarda (OMM) lokalize olup, dış zar füzyonu için gereklidir (Roca-Portoles ve Tait, 2021). Dış zar füzyonunu takiben OPA1, mitokondriyal iç zar füzyonuna aracılık eder.

Fisyon, mitokondriyal bölünme ve kalite kontrol için oldukça önemlidir ve dinamik ilişkili protein 1 (Drp1) bu süreçte önemli bir rol oynamaktadır. Üç adet Drp1 reseptörü, mitokondriyal fisyon faktörü (MFF), mitokondriyal dinamik proteinler 49 (MiD49) ve mitokondriyal dinamik proteinler 51 (MiD51), Drp1'in sitoplazmadan OMM'ye alınmasında rol oynar (Shen vd., 2022). OMM'de bulunan başka bir protein olan Fisyon 1'in (Fis1) de Drp1'i aldığı gösterilmiştir (Roca-Portoles ve Tait, 2021).



Şekil 2.1. Memeli hücrelerinde mitokondriyal füzyon (A) ve fizyonun (B) şematik gösterimi.

Diğer bir kalite kontrol mekanizması olan mitofaji sürecinde, önce işlevsiz mitokondri tespit edilir, ardından mitokondriyal networkden ayrılır ve mitofagozom tarafından çekilir. Mitofagosom yapıları, mikrotübülle ilişkili protein hafif zincir 3 (LC3) ve GABARAP olarak sınıflandırılan ATG8 ailesi proteinlerinin yokluğunda oluşur. Degredasyon için mitofagozomun lizozomlarla füzyonu, zarar görmüş mitokondrilerin ortadan kaldırılmasının son aşaması için gereklidir (Kulikov vd., 2017). Dört ana mitofaji yolu, serin/treonin-protein kinaz PINK1 (PINK1) /E3 ubiquitin-protein ligaz parkin (Parkin) aracılı mitofaji, Bcl-2/adenovirüs E1B 19 kDa etkileşimli protein 3 (BNIP3)/NIP3 benzeri protein X (NIX) tarafından düzenlenen mitofaji, 1 (FUNDC1) aracılı mitofaji içeren FUN14 alanı ve lipid ilişkili yolaklardır (Kulikov vd., 2017). Degradasyonun tetiklenmesi için, bu dört yolun tümü ATG8 ailesinin üyeleri ile etkileşime girmelidir.

2.2.2. Mitokondriyal katlanmamış protein yanıtı (UPR^{mt})

Protein homeostazının (proteostaz) sürdürülmesi, hücre canlılığının devamı ve yaşlanma üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Dengesiz proteostaz, nörodejeneratif hastalıkların gelişmesine ve yaşa bağlı kas zayıflıklarının oluşumuna neden olabilmektedir. Proteostaz, moleküler şaperonlar ve katlanmamış protein tepki yolları (UPR) gibi stres

kaynaklı tepkiler tarafından kontrol edilmektedir. Mitokondriyal homeostazın hücreler için önemli olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, mitokondriyal homeostazı sürdürmek için, organizmalar bir dizi mitokondriyal kalite kontrol sistemi geliştirmiştir, bunlardan biri mitokondriyal katlanmamış protein yanıtıdır (UPR^{mt}). UPR^{mt}, hücrelerin mitokondriyal işlev bozukluğu sırasında mitokondriyal protein homeostazını koruduğu bir mekanizma olarak tanımlanan adaptif bir transkripsiyonel yanıttır (Inigo ve Chandra, 2022). UPR^{mt} mitokondriyal matrikste katlanmamış proteinlerin birikmesi dâhil olmak üzere çeşitli mitokondriyal stres faktörlerine yanıt olarak aktive edilmektedir (T. Wang vd., 2018). UPR^{mt} mitokondriyal protein homeostazını ve kusurlu organel iyileşmesini destekleyen proteinleri içermektedir. Mitokondri ile ilişkili proteinlerin homeostazını ve hücre sağ-kalımını korumaya yardımcı olan sinyalleri mitokondriden çekirdeğe aktarmaktadır (Gu vd., 2021).

Mitokondri proteinlerin olgunlaşmasında, kusurlu veya gereksiz proteinlerin parçalanmasında işlev gören çok sayıda proteaz ve peptidazlara sahiptir. Protein katlama kapasitesindeki azalma, karmaşık katlanmış proteinlerin veya parçalanamayan protein kümelerinin artmış olması, bozulmuş proteostaz ile sonuçlanmaktadır. Bu dengesizlik hücre tarafından algılanır ve UPR^{mt}'i tetiklemektedir (Vögtle, 2021).

UPR^{mt}, mitokondriyal bütünlüğü koruyarak ve tümör büyümesini teşvik ederek kanserde önemli bir destek sistemi olarak hizmet etmektedir. UPR^{mt}, mtROS'un zararlı etkilerini hafifleten bir dizi şaperonu ve proteazı aktive etmektedir. Mitokondriyal proteinlerin açılması, yanlış katlanması ve toplanması durumları çözülmeden bırakılırsa, protein agregatlarının birikmesi oksidatif stresi daha da artırabilir ve mitokondriyal disfonksiyona yol açabileceği bilinmektedir (Inigo ve Chandra 2022).

Memeli hücrelerinde UPR^{mt} mekanizmasında ATF4, CHOP, HSP60, HSP10, kazeinolitik proteaz proteolitik alt birim (CLpP), LON peptidaz 1, (Lonp1), JNK2, c-Jun, C/EBP proteini, Sirtuin3 (SIRT3) ve ATF5'in önemli rollere sahip oldukları bulunmuştur (Gu vd., 2021). Yapılan çalışmalar, UPR^{mt}'nin birçok tümör tipinde aktive edildiğini ve kanser hücrelerinin büyüme ve ilerleme için yüksek oranda UPR^{mt}'e bağımlı olduklarını göstermektedir (Inigo ve Chandra, 2022). Bu bağlamda, UPR^{mt} kanserin gelişimini teşvik etmekte ve çeşitli mekanizmalar aracılığıyla ilerlemesini hızlandırmaktadır. Kanser hücreleri, çoğalmalarını, büyümelerini ve metastazlarını teşvik etmek için UPR^{mt}'de ATF5, HSP60 ve CLpP gibi sinyal moleküllerini ve transkripsiyonel ürünlerini kullandığı için UPR^{mt}'nin bileşenlerini hedeflenmesinin kanser tedavisi için potansiyel, güvenilir ve etkili bir yöntem olabileceği vurgulanmaktadır (G. Wang vd., 2022).

2.3. Mitokondriyal Proteaz Sistemi

Protein homeostazının korunması, hücre canlılığı için kritik öneme sahiptir. Proteinler doğru şekilde katlanmalı, multimerik kompleksler halinde uygun şekilde bir araya getirilmeli ve hasar gördüğünde veya gereksiz olduğunda yıkılmalıdır. Ökaryotik hücreler, farklı hücresel bölümler arasında koordine edilmiş proteinleri yeniden katlamak, yeniden birleştirmek, yıkmak veya bileşenlerine ayırmak için çeşitli protein kalite kontrol sistemlerine sahiptir (Chen vd., 2011).

Mitokondri, kendi bağımsız protein sentezi ve degradasyon mekanizmasını içermektedir. Mitokondri, farklı mitokondriyal ribozomlar ve çeviri makineleri kullanılarak mitokondriyal matrikste sentezlenen küçük, dairesel, çift sarmallı mitokondriyal genom (mtDNA) tarafından kodlanan 13 proteine ek olarak nükleer genom (nDNA) tarafından kodlanan 1000'den fazla benzersiz protein içermektedir (Kehrein vd., 2013). Bu 13 protein, oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP'nin aerobik üretimi için bir elektron taşıma zincirinde düzenlenmiş beş solunum kompleksi (I-V) oluşturmak üzere nDNA kodlu proteinle birleşerek iç mitokondriyal zarı bulanan solunum zinciri komplekslerinin alt birimlerini oluşturmaktadır (Balsa vd., 2012). Mitokondri ayrıca farklı protein kalite kontrol ve bozunma sistemlerine sahiptir. Sitoplazmada ubiquitin-proteazom sisteminin düzensizliği kanserde gözlemlenmiş olmasına ve FDA onaylı bortezomib gibi proteazom inhibitörleri ile terapötik olarak modüle edilebilmesine rağmen, tümör hücrelerinde mitokondriyal protein kalite kontrolünü baskılayanın etkisi belirsizdir. İnsan mitokondrisinin farklı bölmelerinde yani, dış mitokondriyal zar, zarlar arası boşluk, iç mitokondriyal zar ve mitokondriyal matriks boyunca, mitokondriyal protein bozulmasında yer alan beş ana proteaz dâhil olmak üzere yaklaşık 20 peptidaz bulunmaktadır (Micel vd., 2013).

AAA+ proteaz ailesi, mitokondride protein yıkımı için önemli bir yol sağlamaktadır (Steele ve Glynn, 2019). Protein degradasyonu, hücre homeostazın sürdürülmesinde ve hücre döngüsü regülasyonu, gen ekspresyonu, sinyal transdüksiyonu, immün yanıt, apoptoz ve karsinogenez gibi neredeyse tüm ana hücresel süreçlerin düzenlenmesinde temel bir rol oynamaktadır (S. Zhang ve Mao, 2020). Mitokondriyal matriks, çeşitli hücresel aktiviteler AAA+ süper ailesi ile ilişkili ATPaz'ın evrimsel olarak korunmuş üç proteazını içermektedir. Bunlar; LonP, kazeinolitik peptidaz XP (ClpXP) ve matriks yönelimli AAA (m-AAA) proteazlardır. Bu multimerik proteazların her biri nükleer DNA tarafından kodlanır ve iç mitokondriyal zara veya matrikse aktarılacak üzere bir mitokondriyal hedefleme sekansı, klasik Walker A ve B motiflerine sahip korunmuş bir

AAA+ süper aile ATPaz modülü ve a proteaz alanı içermektedir. Bu üç proteaz, mitokondriyal matriks ve iç mitokondriyal zardaki proteinlerin bozunmasını, işlenmesini ve birleştirilmesini koordine etmektedir. Üç mitokondriyal matriks AAA+ proteazına genel bir bakışla bunların yeni antikanser terapötikleri için varsayılan hedefler olarak rollerinin olabileceği düşünülmektedir (Goard ve Schimmer, 2014).

2.4. Kazeinolitik Proteaz P (CLpP)

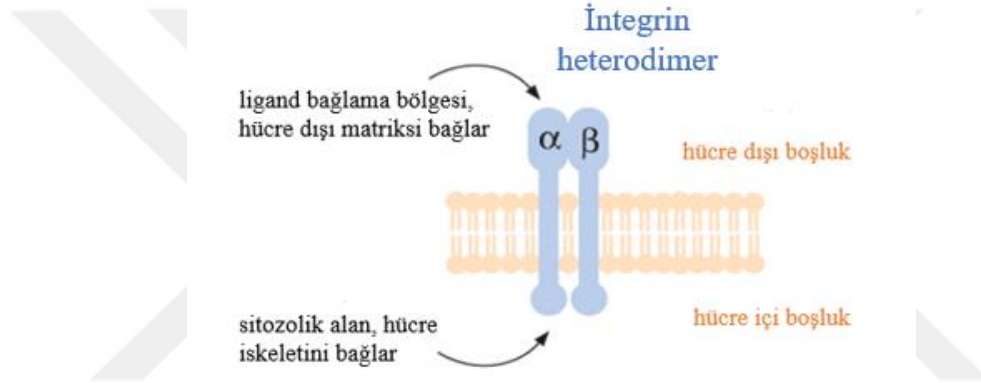
Kazeinolitik proteaz P (CLpP) proteolitik kompleksi ökaryotların mitokondrilerinde bulunan yüksek oranda korunan multimerik bir serin proteaz olarak bilinmektedir (Mabanglo ve Houry, 2022; Nouri vd., 2020).

CLpP, memeli hücrelerinde nükleer DNA tarafından kodlanır ve yanlış katlanmış proteinlerin bozunması yoluyla mitokondriyal proteinlerin kalite kontrolünde merkezi bir rol oynamaktadır. İlk olarak bakterilerde tanımlanmış olan CLpP, potansiyel bir anti-mikrobiyal terapötik hedef olarak ilgi uyandırmıştır (J. Luo vd., 2020). İnsan CLpP aktif formu, insan ClpX (hClpX) ile ilişkili olarak ATP açılımlarına sahip ortak tetradkamerik kompleks iken, yalnızca hClpX bağlanmasıyla indüksiyonu ile tetradkamere kaynaşan, aktif olmayan tek bir heptamerik halka olarak bulunmaktadır. CLpP hedef proteinleri, yağ asidi, amino asit ve enerji metabolizması gibi bir dizi hücresel süreçte rol oynadığı için bakteriyel CLpP'ye benzer şekilde, insan CLpP'si mitokondriyal solunum verimliliğini korumak için yanlış katlanmış veya kümelenmiş proteinleri bozmaktadır (Moreno-Cinos vd., 2019).

CLpP'nin protein degradasyonundaki rolü sayesinde, protein homeostazı korunmakta ve protein kalitesinin kontrolü sağlanmaktadır. Hasarlı polipeptitler önce UPR^{mt} ile onarılmakta, ardından onarılmamış veya ciddi şekilde hasar görmüş polipeptitler CLpP tarafından yıkılmaktadır. CLpP tarafından parçalanan peptitler, mitokondri dışına taşınmakta ve ATP bağlayıcı kaset alt ailesi B üyesi 10 (Abcb10) tarafından UPR^{mt}'yi tetiklemektedir. Küçük ubiquitin benzeri protein 5 (UBL5), Hs pd1 ve Hs p9 gibi mitokondriyal şaperonların promotorlarına bağlanarak transkripsiyonu desteklemektedir (B. Luo vd., 2021). Memeli hücrelerinin son proteomik analizleri, CLpP'nin, çoğu mitokondriyal ETC'nin bileşenleri, translasyonda aktif olan mitokondriyal ribozomun alt birimleri veya mitokondriyal metabolizmada yer alan enzimler olan mitokondriyal iç zar ve matriks proteinlerinin devri için gerekli olduğunu göstermektedir (Hu ve diğerleri, 2019).

2.5. İntegrinler

İntegrinler, birçok hücre tipi tarafından eksprese edilen geniş bir glikoprotein ailesidir (Neri vd., 2011). İntegrinler, hücrelerin çevrelerine hem bağlanmasında hem de yanıt vermesinde önemli rol oynamaktadır. Fonksiyonel integrinler, hücre içini hücre dışına bağlayan hücre zarı boyunca uzanan iki glikoprotein alt biriminden (karbonhidrat bileşenleri içeren protein yapıları) oluşmaktadır. Bu alt birimlere alfa (α) zinciri ve beta (β) zinciri denilmektedir. Her integrin her zaman bir α zinciri ve bir β zinciri içermektedir. Hem α hem de β alt birimleri, hücrenin diğer hücrelere veya çevreye bağlanmasına katkıda bulunmaktadır (Calderwood, 2004).



Şekil 2.2. Bir hücre yüzey protein reseptörü olan integrinin temel yapısı.

Bugüne kadar 17 α ve 8'i β integrin alt birimi tanımlanmıştır. Doğada bu alt birimlerin bir araya gelmesinden yaklaşık 24 integrin oluşmakta, bu da tüm olası kombinasyonların mutlaka var olmadığını göstermektedir. İntegrinler, birden fazla liganda bağlanabilmektedir. Bu ligandlar esas olarak hücreler (hücre dışı matriks molekülleri) için dış ortamda bulunmaktadır. Diğer hücreler tarafından salınan büyüme faktörleri gibi sinyal molekülleri olarak da rol oynamaktadırlar. İntegrinler, sadece hücre adezyonunda değil, aynı zamanda hücre hareketi ve göçünde de önemli yere sahiptirler (Wehrle-Haller ve Imhof, 2003).

Özellikle $\alpha 5 \beta 1$ (VLA-5) ve $\alpha 4 \beta 1$ (VLA-4)'in, MM hücre adezyonunu, göçünü, homingini, invazyonunu ve ayrıca ilaç direncini düzenlediği gösterilmiştir. İntegrin- $\beta 7$, MM hücrelerinin Kİ ile yapışkan etkileşimini arttırdığı ve vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) üretimini arttırarak ilaç direncine yol açtığı için MM biyolojisinde

önemli bir yere sahiptir (Ryu vd., 2016). Bu integrinlerin aktivitesi, hem doğrudan integrinlerin Kİ-Ekstrasellüler matriks (ECM) moleküllerine bağlanması yoluyla hem de içten dışa sinyallemeyle indüklenen konformasyonel değişiklikler yoluyla düzenlenmektedir (Neri vd., 2011).

2.5.1.VLA-4

VLA-4, integrin $\alpha 4$ ve $\beta 1$ 'in bir heterodimeri olarak tanımlanmaktadır. VLA-4, MM hücrelerinde eksprese edilmekte ve fibronektin gibi ECM'e bağlanmaya aracılık etmektedir. MM hücrelerinin fibronektine bağlanması, p27'yi yukarı yönde regüle etmekte ve MM hücrelerinde NF κ B aktivasyonunu indüklemekte, bu da geleneksel kemoterapiye hücre adezyon aracılı ilaç direnci (CAM-DR) oluşumuna sebep olmaktadır (Hosen, 2020). VLA-4, hücre ECM'nin yanı sıra hücre-hücre etkileşimlerine aracılık ettiği kesin olarak gösterilen tek heterodimer olduğu için integrinler arasında benzersiz olduğu düşünülmektedir (Damiano vd., 1999).

2.5.2. VLA-5

Deneysel kanıtlar, $\beta 1$ integrinlerinin ve fibronektin (FN)'nin apoptotik baskılama ve hücre sağkalımında rol oynadığını göstermiştir. Özellikle, FN adezyonunun VLA-5 yoluyla gerçekleştiği gösterilmiştir. VLA-5, Bcl-2'yi yukarı doğru düzenleyerek hücrelerde serum açlığının neden olduğu apoptozu engellediği gözlemlenmiştir. VLA-5, integrin ailesinin ana FN reseptörü olarak bilinmektedir. Malignite sırasında çoğu B hücresinde VLA-5 ekspresyonunun değişken olduğu rapor edilmiştir (Damiano vd., 1999)

2.5.3. İntegrin- $\beta 7$

İntegrin $\beta 7$, MM hücrelerinde ifade edilen glikoprotein ailesindendir. İntegrin $\beta 7$ gen ekspresyonunun MAF geni tarafından düzenlendiği ve bu nedenle integrin $\beta 7$ 'nin MAF ekspresyonu yüksek olan MM hastalarında, özellikle IgH-MAF translokasyonu olanlarda yüksek oranda eksprese edildiği bildirilmiştir (Hosen, 2020). İntegrin- $\beta 7$ alt ailesinin, lökositler tarafından eksprese edilen, lenfoid yapı oluşumunda, gastrointestinal mukozaya ev sahipliği yapan plazma hücrelerinde ve inflamatuvar tepkilerde rol oynadığı bilinen 2 üyesi ($\alpha 4\beta 7$ ve $\alpha E\beta 7$) bulunmaktadır. Ligandları olan mukozal vasküler adresleme hücre adezyon molekülü 1 (MAdCAM-1) ve E-kadherin, endotel hücrelerinin, Kİ stromal hücrelerinin ve ayrıca epitel hücrelerin yüzeyinde bulunmaktadır. $\alpha 4\beta 7$ 'nin MAdCAM-1 ile etkileşimi, dolaşımdaki lenfositlerin bağırsağın lamina propria ve dokuya özgü göçüne izin verirken, $\alpha E\beta 7$ E-kadherin bağlanması yoluyla bağırsak epiteli içindeki intraepitelyal

lenfositleri tutmaktadır (Binion vd., 1997). Integrin $\beta 7$ 'nin ayrıca kolit, diyabetik ve manto hücreli lenfomada lenfomatöz polipoz, timik lenfoma ve mukoza ile ilişkili T ve B hücreli olmayan lenfoid maligniteler gibi çeşitli hastalıkların patogeneğinde yer aldığı rapor edilmiştir (Aapro, 1991). Bu bulgular, $\beta 7$ -integrinin bağışıklık sisteminin fizyolojik fonksiyonları ve patolojik değişiklikleri için önemli bir rol oynadığını göstermektedir. MM hücrelerinde bortezomib veya melfalan ile tedavi edilen integrin- $\beta 7$ susturulmuş hücrelerde FN adezyonunun aracılık ettiği koruyucu etkide kısmi bir kayıp göstererek integrin- $\beta 7$ 'nin CAM-DR'ye katkısını in vitro olarak doğrulanmıştır (Neri vd., 2011). Bununla birlikte, MM hücrelerinde rol oynadığı biyolojik yollar hakkında çok az şey bilinmektedir.

2.6. Kısa Saç Tokası RNA'lar (Short Hairpin RNA'lar, shRNA)

Gen ifadesi, transkripsiyon sonrası çeşitli şekillerde düzenlenebilmektedir. Son yıllarda, RNA interferansının (RNAi) kullanımı, memeli hücrelerinde gen fonksiyonunun incelenmesi için güçlü bir araç olarak ortaya çıkmıştır. RNAi'nin mekanizması, konakçı mRNA'nın, hedef diziye özdeş çift sarmallı RNA'nın (dsRNA) sitoplazmik iletimi yoluyla diziye özgü degradasyonuna dayanmaktadır. Örneğin, küçük RNA içeren RNA kaynaklı susturma kompleksinin (RISC) translasyon inhibisyonu veya RNA degradasyonu için mRNA'yı hedeflediği RNAi mekanizmasıdır (Iwakawa ve Tomari, 2015). siRNA'lar olarak bilinen bu küçük RNA molekülleri, hedef mRNA'larını tamamlayıcı dizilere sahiptir. Öncül RNA'lar (pre-shRNA'lar), çekirdekte sentezlenen ve exportin-5 yardımıyla nükleer zarın nükleer por komplekslerinden (NPC) geçerek sitoplazmaya giren saç tokası şeklinde olan yapılardır. Sitoplazma, 3' ucunda 2-nükleotid (nt) uzantısı olan çift sarmallı bir siRNA yapısı oluşturmak üzere Dicer enzimi tarafından bölünür ve bu siRNA'lar RISC kompleksine katılır (Rao vd., 2009).

shRNA sistemleri, ekspresyonlarını sürdürmek için kullanılan RNA polimerazlarına (II ve III) göre Sınıf I (RNA Pol III) ve Sınıf II (RNA Pol II) saç tokaları şeklinde sınıflandırılabilir. Daha genel bir strateji olarak sunulan Sınıf I saç tokaları veya basit saç tokaları, 19–29 bp dsRNA içerir ve RNA polimeraz III promotörü (insan veya fare U6 snRNA veya insan RNaseP (H1) RNA promotörü) tarafından yönlendirilir. 4-9 nükleotid halka (loop) yapısı, exportin-5 ve shRNA'nın NPC'lerden nükleer çıkışı ve bunların Dicer'in PAZ alanı ile etkileşim yoluyla RNAi yoluna girişi için kritiktir. Pol III sistemi, geçici veya sürekli ifade için kullanılır. Pol III tabanlı destekleyicilerin çoğu çok güçlüdür ve uzun süreli susturma sağlar. Pol III shRNA ekspresyonunun bir dezavantajı, pol III transkripsiyonunun doku özgüllüğünün olmamasıdır. Bu sorun, loxP rekombinasyonu tarafından etkinleştirilen

pol III kullanılarak kısmen çözülmüştür. Hedeflenen transgen, farklı dokularda Cre rekombinaz ifade edenlerle birleştirilebildiği için fonksiyonel ve çok yönlüdür. Bununla birlikte, loxP stratejileri, iki transgen ve rekombinasyon taraması gerektirerek daha karmaşık olabilir. Sınıf I saç tokaları, geleneksel miRNA'lara benzer olarak işlenmemiş haldedir. Sınıf II saç tokaları, miRNA öncüllerinden modellenmiştir (Taxman vd., 2010).

İkinci shRNA ekspresyon stratejisinde, sınıf II saç tokaları, shRNA'lar, RNA pol II promotorlarından eksprese edilen endojen miRNA'lardan oluşturulur. Bu miRNA tabanlı shRNA'lar, Drosha enzimleri aracılığıyla sinyal yollarına girer. Bu miRNA tabanlı shRNA'ların basit saç tokalarına göre çeşitli avantajları vardır. İlk olarak, shRNA ifade platformları genişletir ve tet ile düzenlenen veya dokuya özgü promotörler gibi Pol II ifade sistemlerinden ifade edilebilir. Daha sonra Drosha ve Dicer'in sayesinde 22 nt'lik bir dizi RISC'ye dâhil edilir. Bu özellik sayesinde aktif hedef dizilerini tahmin eden algoritmalar kullanılarak geliştirilebilir (Ashihara vd., 2010; Taxman vd., 2010).

Sentetik olarak sentezlenen sentezlenmiş shRNA'lar da oldukça aktiftir. 25–29 nt dsRNA ve 2 nt 3' çıkıntı içeren shRNA'lar, aynı hedef diziyi içeren siRNA'lardan daha etkilidir. Bunun nedeni, doğrudan RISC alımı yerine Dicer işlemi yoluyla RNAi yolunu başlatmasıdır (Siolas vd., 2005).

İfadeyi düzenlemenin diğer bir yolu, indüklenebilir bir sistem kullanmaktır. Bu sistemler, indükleyiciler tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir ve transkripsiyon doza bağımlı ve geri dönüşümlü düzenleme ile kontrol edilir. İndüklenebilir Pol III tabanlı sistemler, tetrasiklin veya ekdison yanıtları için düzenlenir. Doksisiklin gibi tetrasiklin analogları in vivo çalışmalarda kullanılmaktadır (Taxman vd., 2010).

siRNA kullanımının önemli bir sınırlaması, memeli hücrelerinde stabil veya indüklenebilir gen susturma fonksiyonunun olmamasıdır. Memeli hücre sistemlerinde RNAi sinyalinin başlatıcıları olan uzun dsRNA'ların, siRNA'ların veya shRNA'ların geçici transfeksiyonu, 2-7 gün süren geçici etkiler üretir. (Brummelkamp vd., 2002; Taxman vd., 2010). shRNA, hücre içerisine bir plazmid veya viral vektör aracılığıyla verilmektedir. Bu tür vektör sistemleri, memeli hücrelerinde hedef genlerin etkin ve stabil bir şekilde degradasyonunda başarıyla kullanılmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, shRNA'ların siRNA'ya oranla RNAi indüklenmesinde daha kuvvetli bir etki gösterdiğini bilinmektedir. shRNA kodlanmasında görevli viral veya plazmid DNA (pDNA) vektörleri, shRNA üretimini hücre nükleusunda sentezlediği için uzun süreli bir baskılama gerçekleştirmektedir (Mittal, 2004).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Multiple Miyelom (MM) Hücre hatları

İnsan MM hücre hatları olan NCI H929 ve RPMI 8226 hücreleri ATCC hücre kültürü koleksiyonundan TÜBİTAK 113Z383 Kariyer Destek Projesi kapsamında ATCC'den temin edilmiştir.

3.1.2. Aletler ve Cihazlar

Kimyasalların ve numunelerin uzun süreli saklanması için -80 buzdolabı (Thermo Scientific) kullanıldı. Buzdolabı +4 /-20 (Siemens) kimyasal ve kitlerin stabil şekilde saklanması için kullanılmıştır. Hücreler için kültür ortamı sağlamak üzere bir inkübatör (Thermo Electron Corporation) kullanıldı. Laminar Akışlı Steril Kabin (Nuanre), hücre kültürü çalışmalarını ve hücre kültüründe potansiyel kontaminasyon risklerini en aza indirmek için bazı kimyasal solüsyonları hazırlamak için kullanıldı. Mikroskop (Olympus) hücrelerin sağlıklarının kontrol edilmesinde ve hücre sayımının yapılmasında kullanılmıştır. Hücrelerin pasajlanması veya besi ortamından uzaklaştırılması için MikroSantrifüj (Beckman) kullanılmıştır. Epoch Mikroplaka Spektrofotometre (BioTek) RNA saflığının belirlenmesinde ve protein miktarının tayin edilmesinde kullanılmıştır. PZR Cihazı (BioRad) primerlerin TM sıcaklıklarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Pipet Seti (Eppendorf) hassas ölçümlerin yapılmasında ve deney setlerin kurulmasında kullanılmıştır. Gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için qPCR analizleri Light Cycler 480 -II (Roche) cihazında gerçekleştirilmiştir.

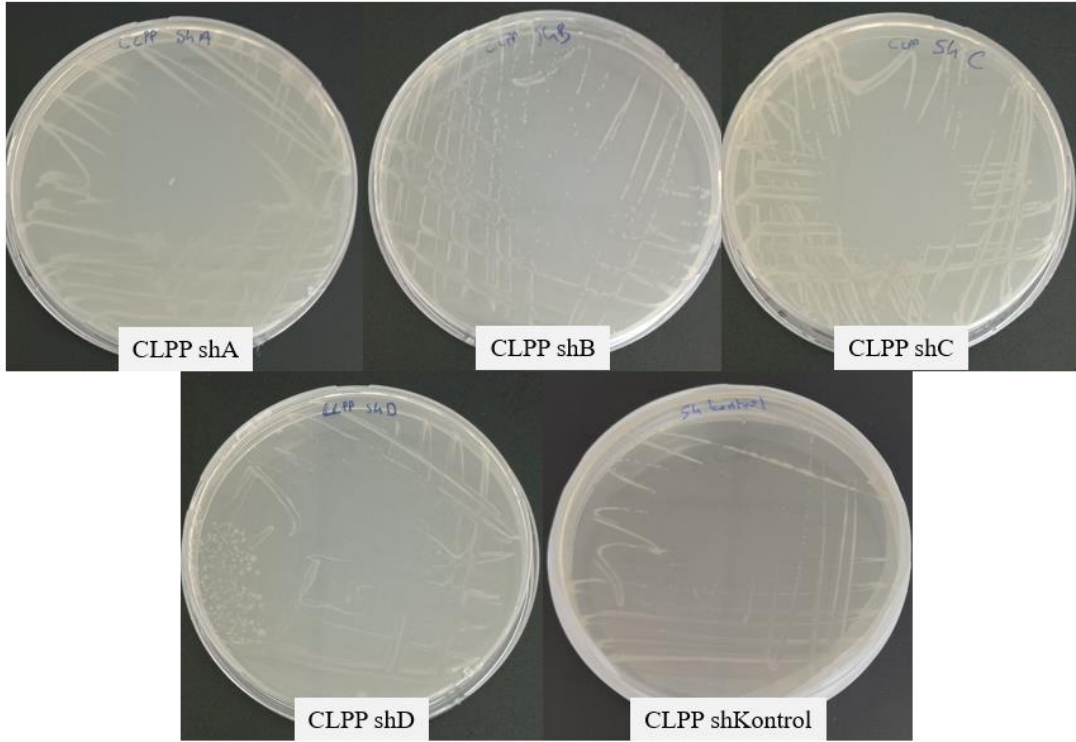
3.2. Yöntem

3.2.1. Lentiviral Paketleme ve shRNA Plazmidlerinin Temini ve Çoğaltılması

CLpP Human shRNA Plasmid kit (ID 8192), Scrambled shRNA control in pGFP-C-shLenti shRNA Vector plazmidleri ve pMD.G2 ve pPAX2 paketleme plazmidleri ORIGENE firmasından ticari olarak temin edilmiştir. Sonrasında ekonomik bir yöntem olan TSS yöntemiyle plazmidler *E. Coli* suşu olan STBL3 hücrelerine aktarılmış ve plazmidlerin çoğaltılması işlemi gerçekleştirilmiştir. CLpP'nin inhibisyonu 118Z535 nolu TÜBİTAK projesi tarafından desteklenmiştir.

3.2.2. Bakteri Hücrelerinin Aynı Solüsyonda Dönüştürülmesi ve Saklanması (TSS)

Kompetent hücre oluşturma için, peg4000, DMSO, MgCl₂, Lizojen suyu (LB) 8 mL için hazırlandı. TSS karışımı laminar kabin içerisinde filtreden geçirilerek hazır hale getirildi. Ardından TSS karışımı +4 °C'ye kaldırıldı. 2 mL LB'de inkübe edilen stb13 kültürü 1:100 oranında dilüe edildi. 10 mL'ye ulaşan Stb13'ün O.D₆₀₀ değerini ölçmek için inkübatöre bırakıldı. Her saat spektrofotometre ile ölçüm gerçekleştirildi. O.D₆₀₀ değeri 0,2-0,4 aralığına ulaşıldığında inkübasyon durduruldu ve 10 dakika buz üzerinde tutularak bölünmenin durması sağlandı. +4 °C 1000xg'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatat uzaklaştırıldı ve bakteri pelleti 200 µL TSS ile çözdürüldü. Bu aşamada her çalışma tüpü için 20 µL Stb13 kullanıldı. Her tüpe CLpP shkontrol, shA, shB, shC, shD vektörleri olmak üzere 10 ng plazmid içeriği ile muamele edildikten sonra D-glukoz ile zenginleştirilmiş LB sıvı besiyeri içerisinde 1 saat inkübe edildi. Stb13 tek koloni seçilimi yapabilmek için LB agar yapıldı. Vektörler kloromfenikol direnç geni içerdiği için agarda kloromfenikol ile seçim yapıldı. Bek alevi başında agarlar döküldü. Donmasının ardından CLpP shkontrol, shA, shB, shC, shD vektörlerini içeren Stb13 hücreleri alev ile steril edilen öze yardımı ile tek koloni ekimi yapıldı. Bir tane agarda pozitif kontrol olarak stb13 tek koloni olarak ekildi. Negatif kontrol olarak sadece kloromfenikol içeren agar bulundu. Ekim yapılan petri kapları 37 °C'de inkübatörde bir gece bırakıldı.



Şekil 3.1. Kloromfenikol içeren LB agar besiyerinde büyümüş ilgili shRNA plazmidini içeren STBL3 kolonileri.

3.2.3. Plazmid İzolasyonu

Tek koloni olarak büyümeleri sağlanan vektörlerden Maxiprep kit kullanımı ile izolasyon yapıldı. Her vektörden bir koloni seçilerek 50 mL kloromfenikol içeren LB'ye karıştırıldı ve 37 °C inkübatöre bırakıldı. Promega PureYield™ Plazmit Maxiprep Sistemi Teknik Kılavuzu kullanıldı ve plazmid izolasyonu gerçekleştirildi.

Çizelge 3.1. İzole edilen plazmidlerin yoğunlukları

İlgili Plazmid	Yoğunluk (ng/μl)
shA	885 ng/μl
shB	399 ng/μl
shC	967 ng/μl
shD	736 ng/μl
shKontrol	906 ng/μl

3.2.4. Lentivirüs Üretimi

CLpP ekspresyon seviyelerinin belirlenmesinde shRNA vektör sistemi kullanıldı ve lentiviral sistemlerin geçici transfeksiyon yöntemlerine göre daha uzun vadede etkinlik sağlamasından dolayı lentiviral enfeksiyon yöntemi kullanıldı. Lentivirüs üretimi için ikinci nesil paketlenme yöntemi için protokol şu şekildedir: Lentivirüs üretiminde kullanılan HEK293T hücreleri %10 FBS içeren DMEM besiyeri kullanılarak T75 flaska ekildi. 48 saat sonra hücreler toplandı sayım yapıldı ve cm^2 'ye 70 bin hücre olacak şekilde iki adet T75 flasklardan biri CLpP shkontrol diğeri CLpP shA, shB, shC, shD plazmidleri için adlandırıldı. 25 μM klorokin içeren 7,5 mL %10 FBS'li DMEM besiyerinde ekildi ve 2 saat beklendi. 15 mL'lik falkon tüpün içerisine steril su eklenerek CLpP shA, shB, shC, shD plazmidleri toplam 15 μg olacak şekilde pool yapılarak hazırlandı. İçerisine lentiviral paketlenme plazmidleri olan 3.5 μg pMD.G2 ve 6.5 μg pPAX2 ve CaCl_2 (2.5M) eklenerek birkaç kez alt üst edilerek karıştırıldı ve düşük ayarda vorteklesnerek üzerine 570 μl HBSS (Hank's balanced tuz çözeltisi) damla damla eklendi 5 dakika beklendi. CLpP shkontrol plazmidini için de 15 mL'lik falkon tüpe steril su eklendi 15 μg shkontrol plazmidini 3.5 μg pMD.G2 ve 6.5 μg pPAX2 ve CaCl_2 (2.5M) eklenerek aynı işlemler gerçekleştirildi ve 570 μl HBSS (Hank's balanced tuz çözeltisi) damla damla eklendi ve 5 dakika beklendi. Hazırlanan transfeksiyon karışımları ilgili HEK293T flasklarına eklenerek 16-17 saat inkübasyona bırakıldı. Transfeksiyon besiyeri 7,5 mL taze %10 FBS içeren DMEM besiyeri ile değiştirildi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. Virüs içeren hücre besiyeri toplandı ve 0.45 μM 'lik PVDF (Poliviniliden Florid) filtreden geçirilerek $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı. Hücrelere 7,5 mL taze %10 FBS içeren DMEM besiyeri eklendi 24 saat inkübe edildi. Virüs içeren hücre besiyeri toplandı ve 0.45 μM 'lik PVDF (Poliviniliden Florid) filtreden geçirilerek bir önceki virüs ile birleştirildi. Toplanan DMEM üzerine 3'e 1 oranında Lenti-X concentrator (Clontech) eklendi 5-10 kez alt üst edilerek $+4^\circ\text{C}$ 'de bir gece bekletildi. $+4^\circ\text{C}$ 'de $1500\times g$ 'de 45 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısım alınarak tekrar $+4^\circ\text{C}$ 'de $1500\times g$ 'de 3 dakika santrifüj edildi. Pellet virüs içeren DMEM hacminin 1/100 oranında PBS ile iki kez yıkandı ve elde edilen virüs partikülleri ependorf tüplere 20 μl olacak şekilde alikotlanarak -80°C 'ye kaldırıldı.

3.2.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

Sıvı azot tankında muhafaza edilen HEK293T, NCI H929 ve RPMI 8226 hücreleri 37°C 'lik su banyosunda ısıtılarak seri bir şekilde %10 FBS içeren besiyeri içerisine alındı. DMSO içeren dondurma medyumunun uzaklaştırılması için $800\times g$ 'de 5 dk santrifüj edildi.

Pellet %10 FBS içeren besiyeri ile homojen hale getirildi. Hücreler T25 hücre kültür kaplarına alındı ve ml başına 5×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Yatay bir şekilde T25 hücre kültür kabı 37°C’de inkübatöre kaldırıldı. Mikroskopta hücre yoğunluğu ve morfolojisi kontrol edildikten sonra pasajlama işlemleri 2-3 günde bir gerçekleştirildi.

3.2.6. Enfeksiyon

Kültür edilen hücreler RPMI 8226 ve NCI H929 sayıldı sayım sonucunda 3 mL %10 FBS’li besiyeri içinde 6 kuyucuklu plakalara cm^2 ’sine 70 bin hücre olacak şekilde ekimleri yapıldı. Üretilen lentivirüsten 15 uL ve 8 µg/mL polybrene aynı anda eklendi. Hücrelerin besiyeri bir gün sonra toplandı ve pellet 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra 3 mL taze besiyeri içeren 6 kuyucuklu plakaya bırakıldı.

3.2.7. Pozitif Klonların Seçilimi

İnfekte edilen hücrelerin hepsi vektörü almadığı için infekte edilmiş hücrelerin viral vektör genomunda yer alan seçim markırı olan puromisin ile seçim gerçekleştirildi. Fakat hücrelerin enfeksiyon sonrasında çoğalamaması bu durumu olumsuz etkiledi. Hücrelerin iki pasajdan sonra puromisin uygulamasına geçilememesi durumundan enfeksiyondan 72 saat sonra deney aşamaları gerçekleştirildi.

3.2.8. Protein İzolasyonu ve Kantitasyonu

Hücre sayımı yapıldı ve 500.000 hücre alınarak 200 xg’de 5 dakika santrifüj edildi. Pellet soğuk PBS ile yıkandı santrifüj edildi. PBS uzaklaştırıldı ve pellet üzerine RIPA buffer eklenerek pellet çözdürüldü. Dondurup çözme işleminden sonra oda sıcaklığında köpürünceye kadar pipetaj yapıldı. +4 °C’de 16100g’de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir ependorf tüpe alındı. BSA standartları 2 mg/mL stok hacimden dilüe edilerek hazırlandı. 2mg/Ml - 1,5mg/mL - 1mg/mL - 0,75mg/mL - 0,5mg/mL - 0,25mg/mL - 0,125mg/mL - 0mg/mL olacak şekilde hazırlanarak 96 well plate küçükten büyüğe BSA standartları yüklendi. Örnekler ve Coomassie Blue G250 eklendi. 10 dakika alüminyum folyoya sarılı şekilde çalkalayıcıda inkübe edildi ve 96’lı EPOCH plate reader okuyucuda 595 absorbans değerinde spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

3.2.9. Western Blotlama Yöntemi

Protein miktarları belirlenen örneklerden %5 β-merkaptoetanol laemli buffer hazırlandı. Protein laemli buffer karışımı 95 °C’de 5 dakika inkübe edildi. BioRad TGX FastCast Akrilamid Kiti kullanılarak yükleme ve yürütme jelleri hazırlandı. Jel kasetleri yükleme tankına yerleştirildi kasetlerin arası SDS running buffer ile dolduruldu. Kuyulara

protein laemli buffer karışımları sırasıyla yüklendi. Yükleme jeli boyunca 90V yürütme yapıldı. Yükleme jeli bitip ayırma jeline geçince 80V yürütmeye devam edildi. Marker iyi açıldığında yürütme durduruldu. Jelin membrana aktarımında elektro aktarım metodu kullanıldı. 10 adet transfer bufferla ıslatılmış kurutma kağıdı aktarım tablasına konuldu. Membran kesildi ve tablaya konan 10 kurutma kağıdının üstüne bırakıldı. Jel kasetin arasından çıkarıldı ve membran üzerine yerleştirildi. 10 adet transfer bufferla ıslatılmış kurutma kağıdı jelin üstüne koyuldu ve tablanın üst kapağı kapatılarak aktarım cihazına yerleştirildi. 25V 25 Amp’de 25 dakika membrana aktarıl sağlandı. Membran %5 yağsız süt tozu içeren TBS içerisine alındı ve oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcıda inkübe edilerek bloklama işlemi gerçekleştirildi. Membran 3 defa 5’er dakika 1X TBS ile yıkandı ve primer antikor (CLpP) eklenerek bir gece çalkalayıcıda +4 °C’de bırakıldı. Ertesi sabah üç ayrı kez yıkamaları takiben gece inkübasyonunun ardından TBS ile 3 defa 5’er dakika çalkalayıcıda yıkama yapıldı. CLpP sekonder antikor (Mouse) 1 buçuk saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi. TBS ile 3 defa 5’er dakika çalkalayıcıda yıkama yapıldı ve ECL substratları ile görüntü alındı.

3.2.10. RNA İzolasyonu

İnfeksiyon yapılan RPMI 8226 ve NCI H929 hücrelerinden 72 saatin sonunda $1,5 \times 10^6$ hücre toplandı ve RNA izolasyonu NucleoZOL reaktifi kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler santrifüj edildi ve pellet PBS ile yıkandı. Pellet üzerine 500 µL NucleoZOL ve 200 µL RNaz/DNaz içermeyen su eklendi. Tüpler 15 saniye kuvvetlice alt üst edildi ardından oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. İnkübe sonunda 12.000 xg’de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatanttan 500 µL alınarak yeni eppendorf tüpüne aktarıldı. Alınan süpernatant üzerine 500 µL İzopropanol eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Tüpler 12.000 xg’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı ve pellet üzerine %75’lik etanolden 500 µL eklendi. Tüpler 8.000 xg’de 3 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet kurumaya bırakıldı. Kuruyan pellet üzerine 25 µL RNaz/DNaz içermeyen su ile çözdürüldü. Elde edilen RNA miktarlarının saflığının belirlenmesinde Epoch mikropilaka spektrofotometre kullanıldı. RNA örneğinden, 0,2 mL’lik steril eppendorf tüp içine 2 µL ve son hacim 4 µL olacak şekilde RNaz/DNaz içermeyen su ile tamamlandı. Spektrofotometrede OD260 ve OD280 değerleri ölçüldü. OD260 ve OD280 değerlerinin oranı hesaplanarak RNA’nın saflığı belirlendi. Elde edilen RNA örnekleri -80 °C’de saklandı.

3.2.11. DNaz Muamelesi ve cDNA Sentezi

3.2.11.1. DNaz Muamelesi

Elde edilen RNA örneklerinden DNaz muamelesi için Thermo Scientific™ DNase I, RNase free kiti ile firma talimatlarına uyarak gerçekleştirildi. DNase kit prosedürü Çizelge 3.2.’deki gibidir.

Çizelge 3.2. DNaz Muamelesi

Kit bileşeni	10 µL reaksiyon hacmi için
10X React Buffer	1 µL
DNaseI	1 µL
1 µg RNA	***
DNase/RNase free water	10 µL’ye tamamlanır.

Çizelge 3.2.’deki talimatlara göre hazırlanan reaksiyon tüpleri Çizelge 3.3.’deki PCR koşullarına bırakıldı.

Çizelge 3.3. DNaz PCR koşulları

Adımlar	Sıcaklık	Dakika
1. Adım	37	30 dakika
2. Adım *Reaksiyon tüpüne 10 µL için 1 µL 50 mM EDTA eklenir.	65	10 dakika

3.2.11.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezi BioRad iScript cDNA sentez kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon bileşenleri Çizelge 3.4.’te verildiği şekilde hazırlanarak Çizelge 3.5.’te verilen PCR koşullarına bırakılmıştır.

Çizelge 3.4. BioRad iScript cDNA sentez kiti bileşenleri

Cdna PCR mix bileşenleri (µL) 1 örnek için	
Reaktif	Hacim (µL)
10X RT Buffer	2
25X dNTP mix	0,8
Nuclease-free water	4,2
Toplam reaksiyon	10

Çizelge 3.5. BioRad iScript PCR basamakları

Adımlar	Sıcaklık	Dakika
1. Adım	25 °C	5
2. Adım	46 °C	20
3. Adım	95 °C	1
4. Adım	4 °C	-

3.2.12. Eş-Zamanlı Kantitatif PCR (qPCR)

Kantitatif Eş-Zamanlı PCR (qPCR) reaksiyonları için NYX Teknik Light Cycler 480 -II (Roche) cihazı kullanıldı ve qPCR reaksiyonu üretici firma tarafından sağlanan iScript Reverse Transkripsiyon kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar -80 °C'de saklandı. İlgili genlerin RNA ifadelerinin tespitinde kullanılan primerlerin sekansları Çizelge 3.6.'de verilmiştir.

Çizelge 3.6. Bu çalışmada kullanılan primerlerin sekansları.

İlgili Gen		Primer dizisi	TM (°C)
CLpP	F	CTTTCAGGCTCCGTCCCTATC	60 °C
	R	GTAGAAAGATGGAGGTGAGGGG	
VLA4	F	TGTTTCGGCTACTCGGTCGT	60 °C
	R	TTCCACAAGGTTCTCCATT	
VLA5	F	AAGCCCTGAAGATGCCCTAC	60 °C
	R	CCACCTGACGCTCTTTTG	
ITG7	F	GAGTGAGACCCCAAGAAAAGG	60 °C
	R	GGCGGTCATAGATTTCAC	

shKontrol ve shCLpP hücrelerinin arasındaki gen ifadesi farklılıklarını belirlemek için yapılan qPCR için Roche LightCycler-II 480 cihazı kullanıldı. Yukarıda açıklandığı şekilde elde edilen cDNA'lar SYBR Green qPCR Mastermix protokolüne uygun olarak 96 kuyucuklu plate'lerde spesifik primerler ile çoğaltıldı. Analizden elde edilen piklere ait Cq değerleri gen ifadelerinin belirlenmesinde kullanıldı. Değerler $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanılarak hesaplandı. İnternal gen olarak Hipoksantin Guanin Fosforibozil Transferaz (HPRT) kullanıldı. Gen ifadelerinin belirlenmesinde Çizelge 3.6.'da verilmiş olan 19-22 baz çifti uzunluğunda 4 adet primerin Forward ve Reverse primer karışımları hazırlandı.

3.2.13. İstatiksel Analiz

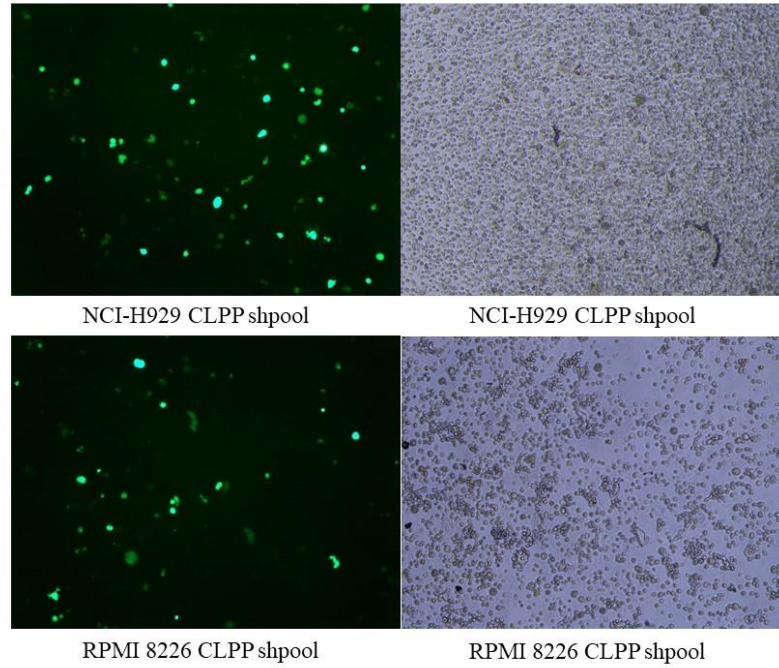
Verilerin istatiksel değerlendirilmesi sırasında bir parametre açısından iki grup arasındaki anlamlı farkların belirlenmesinde bağımsız örneklem Student (unpaired) t-test kullanıldı. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Tüm grafiklerde kullanılan hata çubukları standart sapma (SD)'yı göstermektedir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

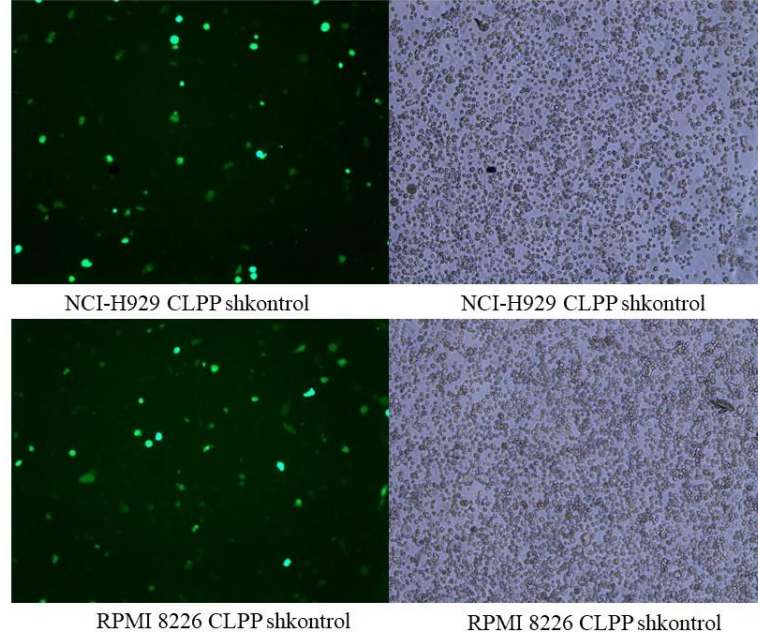
4.1. Araştırma Bulguları

4.1.1. MM Hücrelerinde CLpP İfadesinin İnhibisyonu

CLpP ekspresyon seviyelerinin belirlenmesinde shRNA vektör sistemi kullanıldı. MM hücrelerinde CLpP'yi hedef alan shRNA lentivirüsleri lentiviral enfeksiyon yöntemi kullanılarak uygulandı. Üretilen lentivirüsten 15 uL ve 8 µg/mL polybrene aynı anda eklendi. Hücrelerin besiyeri bir gün sonra toplandı ve pellet 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra 3 mL taze besiyeri içeren 6 kuyucuklu plakaya bırakıldı. 72 saat sonunda hücrelerin floresan mikroskop altında mavi filtrede 10X büyütme ile GFP (yeşil floresan protein) görüntüleri alındı. Firma direktifleri göz önüne alınarak 72 ve 96 saat sonunda enfeksiyon yapılan MM hücrelerinden protein izolasyonu yapılarak CLpP ifadesinin inhibisyonu western blot ile teyit edildi.



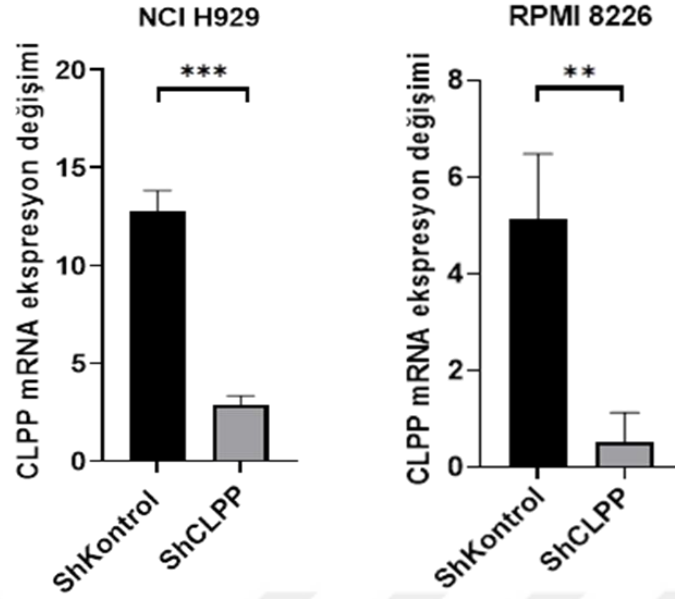
Şekil 4.1. CLpP shpool lentivirüslerinin MM hücrelerine enfeksiyonu. (Nikon floresan mikroskop, 10X objektif).



Şekil 4.2. CLpP shkontrol lentivirüslerinin MM hücrelerine infeksiyonu. (Nikon floresan mikroskop, 10X objektif).

4.1.2. Lentiviral shRNA İnfeksiyonu Sonrası MM Hücrelerinde CLpP mRNA Ekspresyon Değişimi

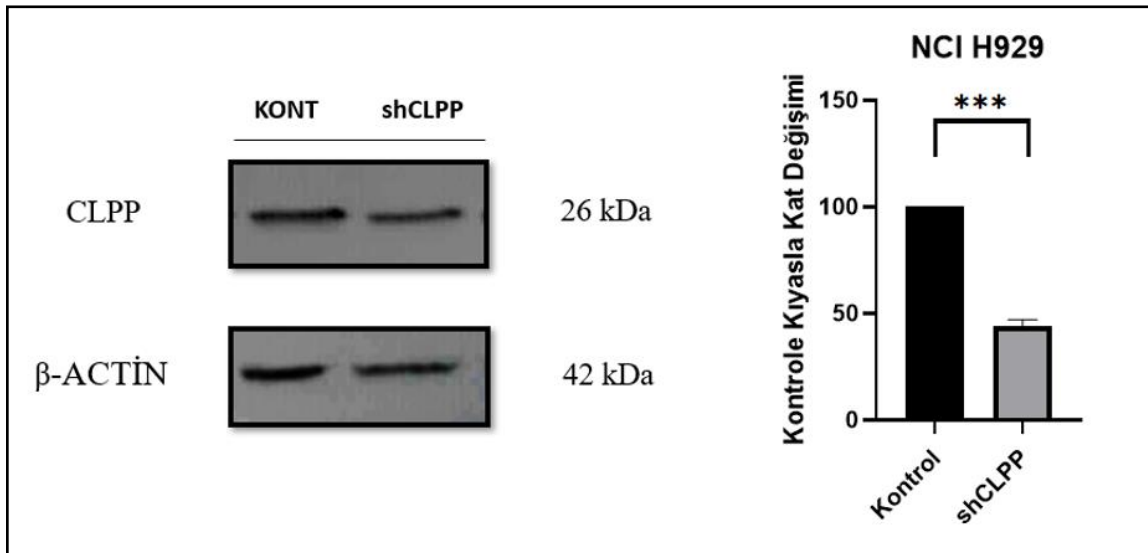
Lentiviral shRNA infeksiyonu sonrası NCI H929 ve RPMI 8226 MM hücrelerinde mRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için 72 saat sonunda RNA izolasyonu yapılmış ve qPCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Lentiviral shRNA ile MM hücrelerinde CLpP inhibisyonunun sağlandığının teyidi olarak, qPCR yöntemi uygulanarak CLpP mRNA ifadesi belirlenmiştir. NCI H929 ve RPMI 8226 hücrelerinde kontrole kıyasla mRNA ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı azalış gözlemlenmiştir ($p<0,05$).



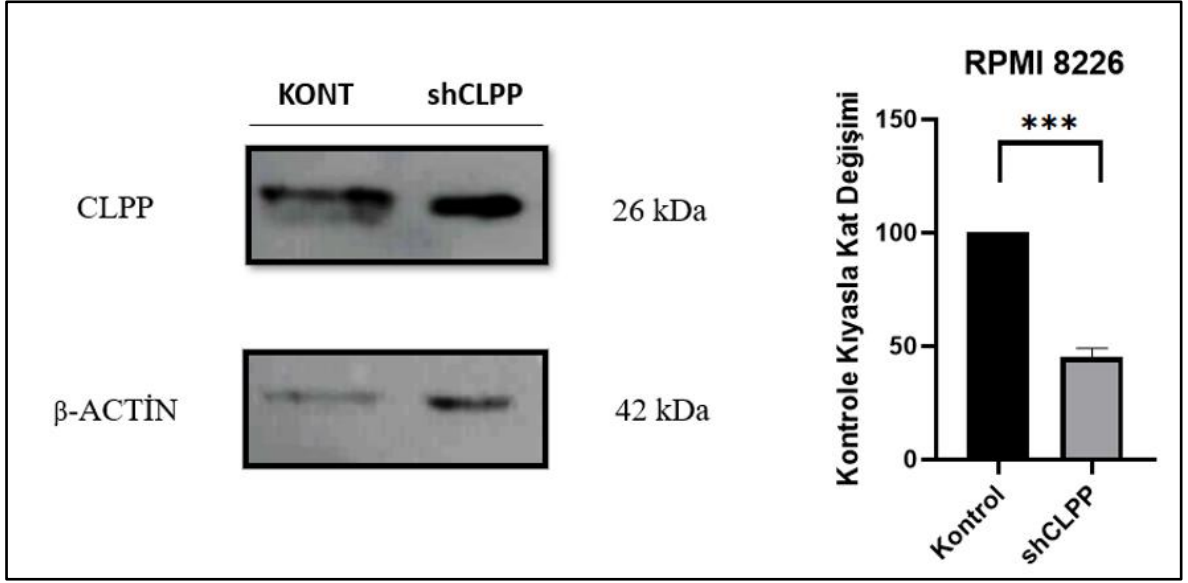
Şekil 4.3. Lentiviral shRNA uygulaması sonrası NCI H929 ve RPMI 8226 MM hücrelerinde CLpP mRNA ekspresyon değişimi (n=3).

4.1.3. MM Hücrelerinde CLpP İfadesinin İnhibisyonunun Protein Seviyede Teyidi

Lentiviral shRNA enfeksiyonu sonrası NCI H929 ve RPMI 8226 MM hücrelerinden yapılan Western Blot deneyleri sonucunda CLpP protein seviyesinin 72 saat sonunda azaldığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.4. CLpP inhibisyonu sonrası NCI H929 hücrelerinde CLpP protein ifadesi (p<0,0001) (n=3).



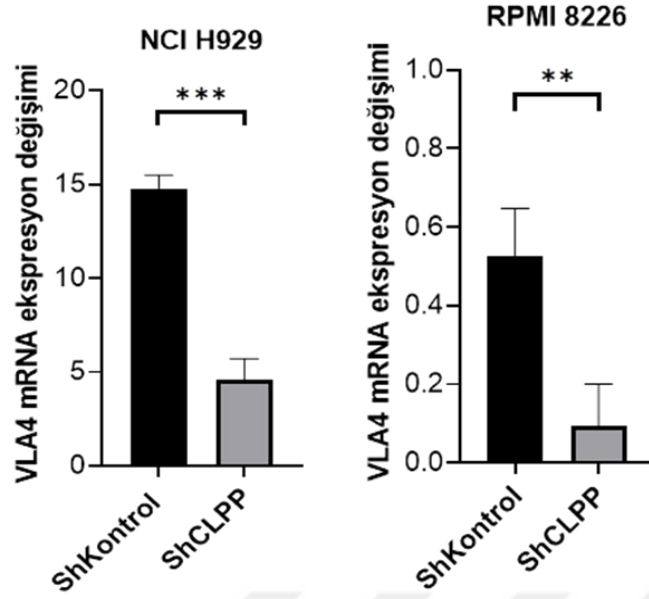
Şekil 4.5. CLpP inhibisyonu sonrası RPMI 8226 hücresinde CLpP protein ifadesi ($p<0,0001$) ($n=3$).

4.1.4. MM hücrelerinde CLpP İnhibisyonunun İntegrin mRNA Ekspresyonları Üzerine Etkisi

MM hücrelerine CLpP shRNA lentivirüslerinin uygulanması sonrası hücrelerden 72 saat sonunda elde edilen RNA örneklerinden integrinlerin mRNA ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir.

4.1.4.1. VLA4 mRNA ekspresyon değişimi

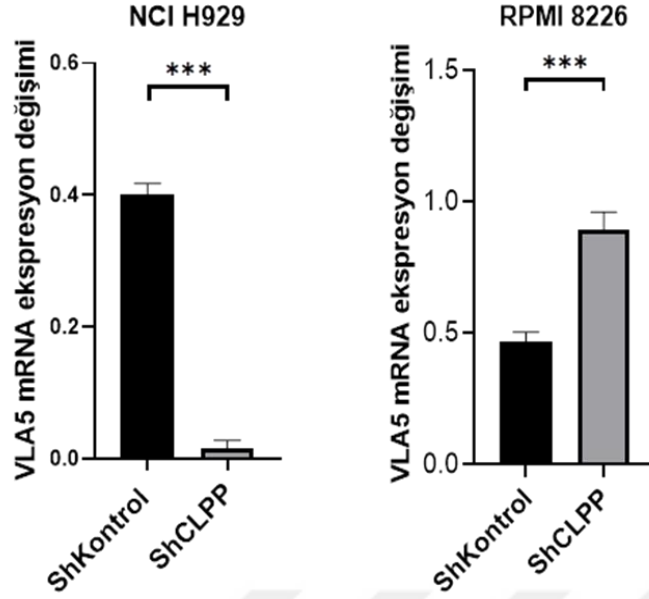
MM hücrelerinde fibronektin gibi ECM'ye bağlanmaya aracılık eden VLA4'ün hücrelerin birbiri ile etkileşimlerinde bulunmasında rol aldığı ve kemoterapiye direncin oluşmasında görev aldığından CLpP inhibisyonunda mRNA ekspresyon seviyesi araştırılmıştır. Üç farklı zamanda elde edilen kontrol hücrelerine kıyasla CLpP inhibisyonu gerçekleştirilen NCI H929 ve RPMI 8226 hücrelerinde VLA4 mRNA ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı azalış gözlemlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Lentiviral shRNA aracılı NCI H929 ve RPMI 8226 hücrelerinde CLpP inhibisyonun VLA4 mRNA ekspresyon düzeyinin değışimi

4.1.4.2. VLA5 mRNA ekspresyon değışimi

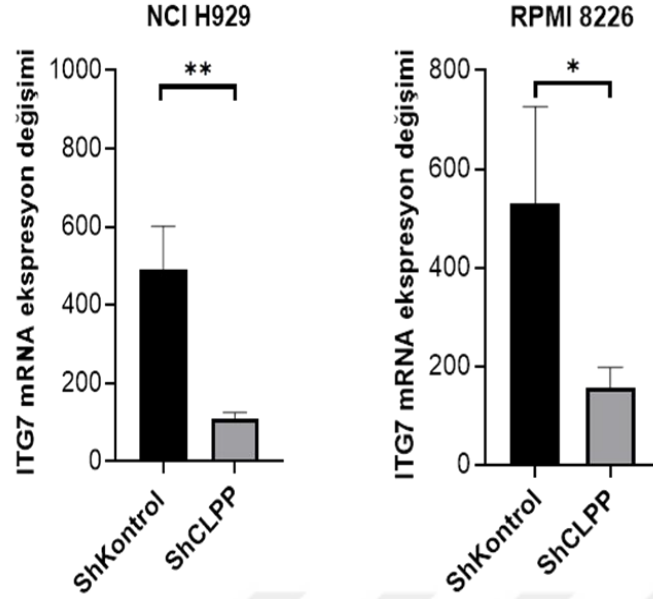
VLA5'in hücre sağ-kalımında rol oynadığı ve fibronektin adezyonunun VLA5 ile gerçekleştiği bilindiğinden, CLpP inhibisyonu gerçekleşen MM hücrelerinde VLA5 mRNA ekspresyon seviyesi araştırılmıştır. Kontrol hücrelerine kıyasla CLpP inhibisyonu gerçekleştirilen NCI H929 hücresinde VLA5 mRNA ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı azalış gözlemlenirken, RPMI 8226 hücrelerinde VLA5 mRNA ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Lentiviral shRNA aracılı NCI H929 RPMI 8226 hücrelerinde CLpP inhibisyonun VLA5 mRNA ekspresyon düzeyinin değişimi

4.1.4.3. İntegrin- β 7 mRNA ekspresyon değişimi

MM hücrelerinde integrin- β 7'nin fibronektin adezyonunda aracılık ettiği ve hücre adezyon aracılı ilaç direncine katkısı doğrulanmıştır. Dolayısıyla, CLpP inhibisyonu gerçekleşen MM hücrelerinde integrin- β 7'nin mRNA ekspresyon seviyesi araştırılmıştır. Kontrol hücrelerine kıyasla CLpP inhibisyonu gerçekleştirilen NCI H929 ve RPMI 8226 hücrelerinde integrin- β 7'nin mRNA ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı azalış saptanmıştır ($p < 0,05$) (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Lentiviral shRNA aracılı NCI H929 ve RPMI 8226 hücrelerinde CLpP inhibisyonun ITG7 mRNA ekspresyon düzeyinin değişimi

4.2. Tartışma

Bu çalışma kapsamında, memeli hücrelerinde nükleer DNA tarafından kodlanan ve mitokondri matriksinde yanlış katlanmış veya hasar görmüş proteinlerin uzaklaştırılmasında rol oynayan CLpP ifadesinin MM hücrelerinde shRNA aracılı inhibisyonunun integrin sinyalizasyonunda görevli VLA4, VLA5 ve integrin- β 7 üzerine olan etkisine ilişkin in vitro çalışmalar gerçekleştirilmiştir. İnsan MM hücre hattı olarak NCI H929 ve RPMI 8226 hücreleri bu çalışmada kullanılarak, bu hücrelerde shRNA lentivirüsleri ile CLpP inhibisyonu sağlanmış ve bu inhibisyonun VLA4, VLA5 ve integrin- β 7'nin mRNA ekspresyonlarını değiştirdiği qPCR yöntemi ile belirlenmiştir.

MM, tüm hematolojik kanserlerin yaklaşık %10'unu oluşturan malign bir plazma hücre bozukluğudur. Mevcut çeşitli tedavi seçeneklerine rağmen, hastaların çoğunun değişken bir tedavi süresinden sonra kaçınılmaz olarak relaps ve mevcut tedavilere dirençli hale gelmesinden dolayı MM hâlâ öldürücü maligniteler arasında yer almaktadır (Besse vd., 2018). Bu nedenle, MM gelişiminin ve ilerlemesinin altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına ihtiyaç vardır.

Birçok bilimsel kanıt MM hücre canlılığının sürdürülmesi ve PI'ne karşı direnç gelişiminde mitokondrinin önemli bir rol oynadığını belirtmektedir (Song vd., 2013; Zheng vd., 2018). Mitokondri, trikarboksilik asit (TCA) döngüsü ve oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) ile ATP üretimi de dâhil olmak üzere birçok metabolik fonksiyonu yerine

getiren, kendi DNA'sı ve ribozomları olan çift membranlı bir organeldir. Enerji üretim rolüne ilaveten, mitokondri ayrıca biyomoleküllerin sentezi, kalsiyum homeostazının sürdürülmesi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ve apoptozda rol oynamaktadır (Fischer vd., 2012). Mitokondri, mitokondriyal proteinlerin uygun şekilde katlanması, hasarlı veya yanlış katlanmış olanların ise bozunması dâhil olmak üzere, optimal protein yapısını ve işlevini sürdürmek için birçok düzenleyici mekanizmaya sahiptir. Bu mekanizmalardan birisi olan UPR^{mt} tarafından düzenlenen mitokondriyal proteostaz, hücresel fonksiyonların sürdürülmesi ve hayatta kalma için çok önemlidir. Mitokondrideki yüksek oksidatif ve proteotoksik stres, MM ilerlemesini teşvik etmek için her yerde bulunan bir UPR^{mt}'nin aktivasyonu ile azaltılmalıdır. Mitokondriyal protein homeostazının korunmasına, şaperonlar ve proteazlar aracılık eder ve proteaz aracılı hidroliz, proteostazın sürdürülmesinde önemli bir rol oynar. Mitokondriyal proteostazın efektörleri arasında, mitokondriyal matriks serin proteazı CLpP, mitokondriyal fonksiyonları sürdürmek için gerekli olan yanlış katlanmış veya hasar görmüş proteinlerin temizlenmesi için mitokondriyal protein kalite kontrolünün anahtar indükleyicisidir (Gai vd., 2022). Bu proteazın yüksek aktivitesi, tümör gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkilidir. Bu proteaz, hipoksi, oksidatif stres veya açlık altında kanser hücresi canlılığını, reaktif oksijen türleri (ROS) seviyelerini ve metabolik yeniden programlanmayı modüle edebilir (Lee vd., 2021).

ClpP'nin, hem inhibisyonu hem de hiperaktivasyonu, farklı mekanizmalar yoluyla da olsa, habis hücreleri öldürdüğü için benzersiz bir kanser hedefi olduğu bildirilmiştir. ClpP'yi inhibe etmek, oksidatif fosforilasyonu bozan ve hücre ölümüne neden olan hasarlı ve yanlış katlanmış solunum zinciri proteinlerinin birikmesine yol açtığı bilinmektedir. Buna karşılık, hiperaktivasyon yapan ClpP, solunum zinciri proteinleri dâhil olmak üzere ClpP substratlarının kontrolsüz ancak seçici bir şekilde bozulmasını sağlar. Sonuç olarak, ClpP'nin hiperaktivasyonu, oksidatif fosforilasyonu da bozan ve hücre ölümüne neden olan solunum zinciri proteinlerinin seviyelerinde azalmaya yol açtığı bulunmuştur (Ishizawa vd., 2019). ClpP, akut miyeloid lösemi, meme, akciğer, karaciğer, yumurtalık, mesane, prostat, rahim, mide, prostat, testis, tiroid ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) dâhil olmak üzere farklı malignitelerde aşırı eksprese edildiği rapor edilmiştir (Cole vd., 2015). ClpP ifadesi, UPR^{mt} gen ifadesi ile pozitif olarak ilişkili olduğu ve bununla birlikte, kanserde düzensiz ifadeye yol açan transkripsiyon faktörleri ve epigenetik işaretler gibi ClpP ifadesinin doğrudan düzenleyicileri henüz tam olarak tanımlanmamıştır (Nouri vd., 2020). AML hücrelerinde, ClpP'nin inhibisyonundan sonra canlılık kaybı, mitokondriyal metabolizma ve oksidatif fosforilasyon bozukluğu ile ilişkilendirildiği bildirilmiştir. Bu

bulgu, AML hücrelerinin ve kök hücrelerin oksidatif fosforilasyona daha fazla bağımlı olduğunu gösteren çalışmalarla tutarlı olduğunu göstermiştir (Cole vd., 2015). ClpP ekspresyonu ile tümör ilerlemesi, hayatta kalma ve ilaç duyarlılığı arasındaki ilişki, bu proteazın insan kanserinde yalnızca terapötik hedefi değil, aynı zamanda yeni bir prognostik ve prediktif belirteci temsil edip edemeyeceğini değerlendirmek için derinlemesine araştırılmalıdır.

MM'da, malign plazma hücreleri kemik iliğinde lokalizedir ve nadiren periferik kanda dolaşırlar (Uchiyama vd., 1992). Kemik iliği mikro çevresinde MM hücreleri, ECM proteinlerine veya kemik iliği stromal hücrelerine yapışır. Bu tür bir adezyona, CD44, VLA4, VLA5, lökosit işleviyle ilişkili antijen 1 (LFA1), nöral hücre adezyon molekülü (NCAM), hücreler arası adezyon molekülü 1 (ICAM1) ve sindekan 1 dâhil olmak üzere adezyon molekülleri aracılık eder. İntegrinler, tümör hücresi çoğalmasına, göçüne ve istilasına aracılık ederek tümörün başlaması, ilerlemesi ve metastazında çok önemli bir rol oynamaktadır. VLA4 MM hücre yapışmasını, göçü, istilayı ve ayrıca MM hücrelerinin fibronektine bağlanması, p27'yi yukarı doğru düzenler ve MM hücrelerinde nükleer faktör κ B (NF κ B) aktivasyonunu indükler bu da geleneksel kemoterapiye hücre adezyon aracılı ilaç direnci sağladığı gösterilmiştir (Hosen, 2020). Yapılan çalışmada CLpP inhibisyonu sonucu VLA4'ün NCI H929 ve RPMI 8226 hücrelerinde kontrole kıyasla mRNA ekspresyon düzeyinde azalma gözlemlenmiştir. CLpP inhibisyonu MM hücrelerinin yapışmasında, göçünde, istilasında ve ayrıca fibronektine bağlanmasında görev alan VLA4'ün ifadesinin azalmasına neden olmuştur. VLA4 ifadesinin azalması hücre göçünün azalmasına neden olacaktır. Böylelikle MM hücrelerinin metastazının azalmasına ve bekasını kaybetmesine neden olacaktır. Bu durum CLpP'nin iyi bir terapötik hedef olduğunu göstermektedir.

MM hücrelerinde VLA5'in ifadesi hücrel büyüme, farklılaşmayı ve hayatta kalmayı düzenlediği bildirilmiştir. MM'de VLA5, adezyon, göç ve homing yoluyla MM hücreleri ve BM nişleri arasındaki etkileşime aracılık eden ana integrinlerden biri olarak tanınmaktadır. Solid tümörü olan hastaların alt popülasyonunda yüksek VLA5 integrin ekspresyonu ile bu hastalar için kötü prognoz arasındaki ilişki, bunun konvansiyonel tedavilere direnç üzerindeki etkisini düşündürmektedir. VLA5'in, tümör ilerlemesinde yer almasının yanı sıra özellikle en agresif tümörlerde aşırı eksprese edilmiş olduğu bilinmektedir. Tümör anjiyogeneze ve tümöral hücre göçüne katılımı ve metastaz nişlerine yapışmasının yanı sıra terapi direnci üzerindeki etkileri, onu gelecek için uygun bir terapötik hedef haline getirmektedir (Schaffner vd., 2013). Yapılan bir çalışmada VLA5'in MM hücrelerinde BCL2 ifadesini arttırarak hücrelerin apoptozdan kaçmasına sebep olduğu

bulunmuştur (Z. Zhang vd., 1995). Bu çalışmada CLpP inhibisyonu gerçekleşen NCI H929 hücrelerinde VLA5 mRNA ekspresyon düzeyinde azalış gözlemlenirken; RPMI 8226 hücrelerinde VLA5 mRNA ekspresyon düzeyinde artış gözlemlenmiştir. NCI H929 hücreleri p53 proteini ifade etmekte RPMI 8226 hücreleri ise p53-/- olduğundan p53 proteini ifade edememektedir. RRMM hastalarda olası bir CLpP inhibisyonu sağlandığında VLA5 ekspresyonundaki azalma hastaların tedaviye yanıtının pozitif yönde ilerleyeceğini düşündürmektedir. Ama RPMI 8226 hücrelerinde gözlemlenen sonuçlar ise bu durumun tam tersini göstermektedir. Bu da MM'da RRMM hastaları açıklamaktadır. MM biyolojisini açıklamak için daha ileri çalışmaların yapılması gerektiğini göstermektedir.

MM hücrelerinde integrin $\beta 7$ 'nin susturulması, fibronektin veya E-kadherine yapışmayı azalttığı ve MM hücrelerinde bortezomib veya melfalan direncine karşı hücreleri hassaslaştırdığı rapor edilmiştir (Ohguchi vd., 2016). Ayrıca bir başka çalışmada integrin $\beta 7$ susturulması sonrası hücrelerin göçünün azaldığı bulunmuştur. Tutarlı bir şekilde, integrin $\beta 7$ susturulması, MM hücrelerinin in vivo olarak kemik iliğine yönlendirilmesini azaltmıştır. Ayrıca integrin- $\beta 7$ MM hücrelerinin BM ile yapışkan etkileşimini arttırdığı ve vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) üretimini arttırarak ilaç direncine yol açtığı için de önemlidir (Ryu vd., 2016)

Bu bulgular, integrin- $\beta 7$ 'nin MM hücre yapışması, göçü ve kemik iliği hedef aramasında çok önemli rollere sahip olduğunu öne sürmüştür. Elde edilen sonuçlar, CLpP inhibisyonu sonucu NCI H929 hücrelerinde ve RPMI 8226 hücrelerinde integrin $\beta 7$ mRNA ekspresyon düzeyinde azalma gözlemlenmiştir. CLpP'nin terapötik hedef olarak ele alınması ilaç direncinde görevli olduğu bilinen integrin- $\beta 7$ 'nin azalan ekspresyon düzeyiyle desteklenmektedir. Ayrıca RRMM hastalarda integrin- $\beta 7$ aracılı VEGF üretimi azalacağından hücrelerin tedaviye verdiği yanıt pozitif olarak değişecektir.

Bu çalışma da elde edilen tüm sonuçlar göze alındığında CLpP'nin terapötik bir hedef olabileceği düşünülmektedir. CLpP inhibisyonu tümör hücresi çoğalmasına, göçüne ve istilasına aracılık eden integrinlerin ifadesinde azalmaya neden olmuştur. İntegrinlerin ifadesinin azalması kanser hücrelerinin tedaviye daha olumlu yanıtlar vermesiyle sonuçlanacaktır. Ayrıca ilaç direnci gelişen hastalarda artan integrin ifadeleri göz önüne alındığında RRMM hastalarda olası bir CLpP inhibisyonunu sağlamak ilaç direncinin üstesinden gelebileceğini düşündürmektedir. Bu sonuçlar ışığında CLpP'nin inhibisyonu sonucu MM hastalarında ne gibi sonuçlar ortaya çıkaracağı açık olarak bilinmemektedir. Bu yüzden CLpP inhibisyonun MM biyolojisi üzerine etkisi daha ileri çalışmalarla araştırılması gerekmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, shRNA vektör sistemi kullanılarak lentivirüs üretimi gerçekleştirildi. NCI H929, RPMI 8226 MM hücre hatlarında lentiviral infeksiyon yapıldı. Hücrelerin infeksiyondan sonra proliferasyonlarının azaldığı gözlemlenmiştir. Hücrelerde puromisin seçilimi gerçekleştirilememiştir. Firma talimatlarına göre hücrelerden infeksiyondan 72 saat ve 96 saatin sonunda protein elde edildi. Protein ile gerçekleştirilen western blot sonunda 72 saatinde hücrelerde kontrol hücrelerine kıyasla CLpP inhibisyonunun gerçekleştiği bulundu. Ardından 72 saat sonunda integrin ailesinden VLA4, VLA5 ve integrin $\beta 7$ genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri shkontrol ve shCLpP uygulanarak NCI H929 ve RPMI 8226 hücrelerinde qPCR kullanılarak araştırılmıştır. Kontrol hücrelere kıyasla CLpP inhibisyonu gerçekleştirilen NCI H929 ve RPMI 8226 hücrelerinde VLA4 mRNA ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı azalış gözlemlenmiştir. Kontrol hücrelerine kıyasla CLpP inhibisyonu gerçekleştirilen NCI H929 hücresinde VLA5 mRNA ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı azalış gözlemlenirken RPMI 8226 hücrelerinde VLA5 mRNA ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlenmiştir. Kontrol hücrelerine kıyasla CLpP inhibisyonu gerçekleştirilen NCI H929 ve RPMI 8226 hücrelerinde integrin- $\beta 7$ 'nin mRNA ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı azalış gözlemlenmiştir.

CLpP'nin MM'da ilaç direnci veya hücre proliferasyonu ile ilişkisi tam olarak belirtilmemiştir. İntegrinlerin MM hücrelerinin proliferasyonu ve ilaç direncinde rollerinin olduğu bilinmektedir. Bu yüzden CLpP ve integrinlerin araştırıldığı her çalışma MM biyolojisinin aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Aapro, M. S. 1991. "Present role of corticosteroids as antiemetics.". Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer, 121, 91-100.
- Ashihara, E., Kawata, E., Maekawa, T. 2010. "Future Prospect of RNA Interference for Cancer Therapies". Current Drug Targets, 11(3), 345-360.
- Ashton, T. M., McKenna, W. G., Kunz-Schughart, L. A., Higgins, G. S. 2018. "Oxidative Phosphorylation as an Emerging Target in Cancer Therapy". Clinical Cancer Research, 24(11), 2482-2490.
- Balsa, E., Marco, R., Perales-Clemente, E., Szklarczyk, R., Calvo, E., Landázuri, M. O., Enríquez, J. A. 2012. "NDUFA4 Is a Subunit of Complex IV of the Mammalian Electron Transport Chain". Cell Metabolism, 16(3), 378-386.
- Barbato, A., Scandura, G., Puglisi, F., Cambria, D., La Spina, E., Palumbo, G. A., ... Romano, A. 2020. "Mitochondrial Bioenergetics at the Onset of Drug Resistance in Hematological Malignancies: An Overview". Frontiers in Oncology, 10.
- Besse, A., Stolze, S. C., Rasche, L., Weinhold, N., Morgan, G. J., Kraus, M., ... Driessen, C. 2018. "Carfilzomib resistance due to ABCB1/MDR1 overexpression is overcome by nelfinavir and lopinavir in multiple myeloma". Leukemia, 32(2), 391-401.
- Binion, D., West, G., Ina, K., Ziats, N., Emancipator, S., Fiocchi, C. 1997. "Enhanced leukocyte binding by intestinal microvascular endothelial cells in inflammatory bowel disease". Gastroenterology, 112(6), 1895-1907.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., Agami, R. 2002. "A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells". Science, 296(5567), 550-553.
- Calderwood, D. A. 2004. "Integrin activation". Journal of Cell Science, 117(5), 657-666.
- Chen, B., Retzlaff, M., Roos, T., Frydman, J. 2011. "Cellular Strategies of Protein Quality Control". Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 3(8), a004374-a004374.
- Cole, A., Wang, Z., Coyaud, E., Voisin, V., Gronda, M., Jitkova, Y., ... Schimmer, A. D. 2015. "Inhibition of the Mitochondrial Protease ClpP as a Therapeutic Strategy for Human Acute Myeloid Leukemia". Cancer Cell, 27(6), 864-876.

- Damiano, J. S., Cress, A. E., Hazlehurst, L. A., Shtil, A. A., Dalton, W. S. 1999. "Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines.". *Blood*, 93(5), 1658-1667.
- Das, S., Juliana, N., Yazit, N. A. A., Azmani, S., Abu, I. F. 2022. "Multiple Myeloma: Challenges Encountered and Future Options for Better Treatment". *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1649.
- Fischer, F., Hamann, A., Osiewacz, H. D. 2012. "Mitochondrial quality control: an integrated network of pathways". *Trends in Biochemical Sciences*, 37(7), 284-292.
- Gai, D., Chen, J.-R., Stewart, J. P., Nookaew, I., Habelhah, H., Ashby, C., ... Zhan, F. 2022. "CST6 suppresses osteolytic bone disease in multiple myeloma by blocking osteoclast differentiation". *Journal of Clinical Investigation*, 132(18).
- Goard, C. A., Schimmer, A. D. 2014. "Mitochondrial matrix proteases as novel therapeutic targets in malignancy". *Oncogene*, 33(21), 2690-2699.
- Gozzetti, A., Bocchia, M. 2022. "Steps towards a Multiple Myeloma Cure?". *Journal of Personalized Medicine*, 12(9), 1451.
- Gu, L.-F., Chen, J.-Q., Lin, Q.-Y., Yang, Y.-Z. 2021. "Roles of mitochondrial unfolded protein response in mammalian stem cells". *World Journal of Stem Cells*, 13(7), 737-752.
- Ho, M., Patel, A., Goh, C. Y., Moscvin, M., Zhang, L., Bianchi, G. 2020. "Changing paradigms in diagnosis and treatment of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM)". *Leukemia*, 34(12), 3111-3125.
- Hosen, N. 2020. "Integrins in multiple myeloma". *Inflammation and Regeneration*, 40(1), 4.
- Hu, D., Sun, X., Liao, X., Zhang, X., Zarabi, S., Schimmer, A., ... Qi, X. 2019. "Alpha-synuclein suppresses mitochondrial protease ClpP to trigger mitochondrial oxidative damage and neurotoxicity". *Acta Neuropathologica*, 137(6), 939-960.
- Inigo, J. R., Chandra, D. 2022. "The mitochondrial unfolded protein response (UPRmt): shielding against toxicity to mitochondria in cancer". *Journal of Hematology & Oncology*, 15(1), 98.
- Ishizawa, J., Zarabi, S. F., Davis, R. E., Halgas, O., Nii, T., Jitkova, Y., ... Andreeff, M. 2019. "Mitochondrial ClpP-Mediated Proteolysis Induces Selective Cancer Cell Lethality". *Cancer Cell*, 35(5), 721-737.e9.

- Kehrein, K., Bonnefoy, N., Ott, M. 2013. "Mitochondrial Protein Synthesis: Efficiency and Accuracy". *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(16), 1928-1939.
- Kulikov, A. V., Luchkina, E. A., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B. 2017. "Mitophagy: Link to cancer development and therapy". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(3), 432-439.
- Lee, Y. G., Kim, H. W., Nam, Y., Shin, K. J., Lee, Y. J., Park, D. H., ... Chae, Y. C. 2021. "LONP1 and ClpP cooperatively regulate mitochondrial proteostasis for cancer cell survival". *Oncogenesis*, 10(2), 18.
- Luo, B., Ma, Y., Zhou, Y., Zhang, N., Luo, Y. 2021. "Human ClpP protease, a promising therapy target for diseases of mitochondrial dysfunction". *Drug Discovery Today*, 26(4), 968-981.
- Luo, J., Zeng, B., Tao, C., Lu, M., Ren, G. 2020. "ClpP regulates breast cancer cell proliferation, invasion and apoptosis by modulating the Src/PI3K/Akt signaling pathway". *PeerJ*, 8, e8754.
- Mabanglo, M. F., Houry, W. A. 2022. "Recent structural insights into the mechanism of ClpP protease regulation by AAA+ chaperones and small molecules". *Journal of Biological Chemistry*, 298(5), 101781.
- Maes, K., Menu, E. 2018. "Metabolic Features of Multiple Myeloma". *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1200.
- Micel, L. N., Tentler, J. J., Smith, P. G., Eckhardt, G. S. 2013. "Role of Ubiquitin Ligases and the Proteasome in Oncogenesis: Novel Targets for Anticancer Therapies". *Journal of Clinical Oncology*, 31(9), 1231-1238.
- Michels, T. C., Petersen, K. E. 2017. "Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment.". *American family physician*, 95(6), 373-383. Geliş tarihi gönderen <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28318212>
- Mimura, N., Hideshima, T., Anderson, K. C. 2015. "Novel therapeutic strategies for multiple myeloma". *Experimental Hematology*, 43(8), 732-741.
- Mittal, V. 2004. "Improving the efficiency of RNA interference in mammals". *Nature Reviews Genetics*, 5(5), 355-365.
- Moreno-Cinos, C., Goossens, K., Salado, I. G., Van Der Veken, P., De Winter, H., Augustyns, K. 2019. "ClpP Protease, a Promising Antimicrobial Target". *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2232.

- Neri, P., Ren, L., Azab, A. K., Brentnall, M., Gratton, K., Klimowicz, A. C., ... Bahlis, N. J. 2011. "Integrin $\beta 7$ -mediated regulation of multiple myeloma cell adhesion, migration, and invasion". *Blood*, 117(23), 6202-6213.
- Neumeister, P., Schulz, E., Pansy, K., Szmyra, M., Deutsch, A. J. 2022. "Targeting the Microenvironment for Treating Multiple Myeloma". *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), 7627.
- Ni, H.-M., Williams, J. A., Ding, W.-X. 2015. "Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control". *Redox Biology*, 4, 6-13.
- Nouri, K., Feng, Y., Schimmer, A. D. 2020. "Mitochondrial ClpP serine protease-biological function and emerging target for cancer therapy". *Cell Death & Disease*, 11(10), 841.
- Ohguchi, H., Hideshima, T., Bhasin, M. K., Gorgun, G. T., Santo, L., Cea, M., ... Anderson, K. C. 2016. "The KDM3A–KLF2–IRF4 axis maintains myeloma cell survival". *Nature Communications*, 7(1), 10258.
- Rajkumar, S. V. 2016. "Updated Diagnostic Criteria and Staging System for Multiple Myeloma.". American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting, 35, e418-23.
- Rajkumar, S. V. 2022. "Multiple myeloma: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management". *American Journal of Hematology*, 97(8), 1086-1107.
- Rajkumar, S. V., Dimopoulos, M. A., Palumbo, A., Blade, J., Merlini, G., Mateos, M.-V., ... Miguel, J. F. S. 2014. "International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma.". *The Lancet. Oncology*, 15(12), e538-48.
- Rao, D. D., Vorhies, J. S., Senzer, N., Nemunaitis, J. 2009. "siRNA vs. shRNA: Similarities and differences". *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(9), 746-759.
- Roca-Portoles, A., Tait, S. W. G. 2021. "Mitochondrial quality control: from molecule to organelle". *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(8), 3853-3866.
- Ryu, J., Koh, Y., Park, H., Kim, D. Y., Kim, D. C., Byun, J. M., ... Yoon, S.-S. 2016. "Highly Expressed Integrin- $\alpha 8$ Induces Epithelial to Mesenchymal Transition-Like Features in Multiple Myeloma with Early Relapse". *Molecules and Cells*, 39(12), 898-908.
- Schaffner, F., Ray, A., Dontenwill, M. 2013. "Integrin $\alpha 5 \beta 1$, the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors". *Cancers*, 5(4), 27-47.

- Shen, X., Sun, P., Zhang, H., Yang, H. 2022. "Mitochondrial quality control in the brain: The physiological and pathological roles". *Frontiers in Neuroscience*, 16.
- Siolas, D., Lerner, C., Burchard, J., Ge, W., Linsley, P. S., Paddison, P. J., ... Cleary, M. A. 2005. "Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers". *Nature Biotechnology*, 23(2), 227-231.
- Song, I. S., Kim, H. K., Lee, S. R., Jeong, S. H., Kim, N., Ko, K. S., ... Han, J. 2013. "Mitochondrial modulation decreases the bortezomib-resistance in multiple myeloma cells". *International Journal of Cancer*, 133(6), 1357-1367.
- Steele, T. E., Glynn, S. E. 2019. "Mitochondrial AAA proteases: A stairway to degradation". *Mitochondrion*, 49, 121-127.
- Tanenbaum, B., Miett, T., Patel, S. A. 2023. "The emerging therapeutic landscape of relapsed/refractory multiple myeloma". *Annals of Hematology*, 102(1), 1-11.
- Taxman, D. J., Moore, C. B., Guthrie, E. H., Huang, M. T.-H. 2010. "Short Hairpin RNA (shRNA): Design, Delivery, and Assessment of Gene Knockdown" (ss. 139-156).
- Uchiyama, H., Barut, B., Chauhan, D., Cannistra, S., Anderson, K. 1992. "Characterization of adhesion molecules on human myeloma cell lines". *Blood*, 80(9), 2306-2314.
- Vögtle, F. 2021. "Open questions on the mitochondrial unfolded protein response". *The FEBS Journal*, 288(9), 2856-2869.
- Wallington-Beddoe, C. T., Mynott, R. L. 2021. "Prognostic and predictive biomarker developments in multiple myeloma". *Journal of Hematology & Oncology*, 14(1), 151.
- Wang, G., Fan, Y., Cao, P., Tan, K. 2022. "Insight into the mitochondrial unfolded protein response and cancer: opportunities and challenges". *Cell & Bioscience*, 12(1), 18.
- Wang, T., Babayev, E., Jiang, Z., Li, G., Zhang, M., Esencan, E., ... Seli, E. 2018. "Mitochondrial unfolded protein response gene Clpp is required to maintain ovarian follicular reserve during aging, for oocyte competence, and development of pre-implantation embryos". *Aging Cell*, 17(4), e12784.
- Wehrle-Haller, B., Imhof, B. A. 2003. "Integrin-dependent pathologies". *The Journal of Pathology*, 200(4), 481-487.

- Werner, E., Werb, Z. 2002. "Integrins engage mitochondrial function for signal transduction by a mechanism dependent on Rho GTPases". *Journal of Cell Biology*, 158(2), 357-368.
- Yan, Duanmu, Zeng, Liu, Song. 2019. "Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination". *Cells*, 8(4), 379.
- Zhang, S., Mao, Y. 2020. "AAA+ ATPases in Protein Degradation: Structures, Functions and Mechanisms". *Biomolecules*, 10(4), 629.
- Zhang, X., Zhang, H., Lan, H., Wu, J., Xiao, Y. 2023. "CAR-T cell therapy in multiple myeloma: Current limitations and potential strategies". *Frontiers in Immunology*, 14.
- Zhang, Z., Vuori, K., Reed, J. C., Ruoslahti, E. 1995. "The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression.". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(13), 6161-6165.
- Zhan, X., Yu, W., Franqui-Machin, R., Bates, M. L., Nadiminti, K., Cao, H., ... Tricot, G. 2017. "Alteration of mitochondrial biogenesis promotes disease progression in multiple myeloma". *Oncotarget*, 8(67), 111213-111224.
- Zheng, Z., Fan, S., Zheng, J., Huang, W., Gasparetto, C., Chao, N. J., ... Kang, Y. 2018. "Inhibition of thioredoxin activates mitophagy and overcomes adaptive bortezomib resistance in multiple myeloma". *Journal of Hematology & Oncology*, 11(1), 29.