DOI: 10.14744/iksstd.2021.29494
İKSSTD 2022;14(2):120-124

DENEYSEL ÇALIŞMA / EXPERIMENTAL STUDY

ERAP1 Gen İfadesinin Plazma Hücre Diskrazilerinde İncelenmesi

Investigation of Expression of the ERAP1 Gene in Plasma Cell Dyscrasia

Melda Sarıman[1], Büşra Karaçam[1], Mesut Ayer[2], Sema Sırma Ekmekci[1], İlknur Suer[3], Kıvanç Çefle[4], Şükrü Palanduz[4], Şükrü Öztürk[4], Meliha Nalçacı[5], Neslihan Abacı[1]

[1]İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Ensitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
[2]Sağlık Bilimleri Üniversitesi, İstanbul Haseki Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi, Hematoloji Bölümü, İstanbul, Türkiye
[3]İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
[4]İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Bilimdalı, İstanbul, Türkiye
[5]İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ÖZ

Amaç: Önemi bilinmeyen monoklonal gammopati asemptomatik, multipl miyeloma ise semptomatik bir plazma hücre diskrazisidir. Daha önce yaptığımız RNA dizileme çalışmasında multipl miyeloma hastalarında endoplazmik retikulum aminopeptidaz 1 (ERAP1) geninin ifadesi sağlıklı kemik iliği kontrollerine göre yüksek bulundu ve aday gen olarak belirlendi. Bu çalışmada, ERAP1'in multipl miyeloma patogenezinde doğrudan ya da dolaylı etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlandı.

Yöntem: ERAP1 geninin ifade seviyeleri yeni tanılı, tedavi görmemiş 38 multipl miyeloma hastasından ve 23 önemi bilinmeyen monoklonal gammopati ile 16 kontrol kemik iliği materyallerinde qRT-PCR yöntemi ile incelendi. Elde edilen sonuçlar SPSS 25 istatistik programında analiz edildi.

Bulgular: ERAP1 gen ifadesi multipl miyeloma, önemi bilinmeyen monoklonal gammopati ve kontrol grupları arasında karşılaştırıldığında gen ifadesi açısından anlamlı farklılık saptanmadı (p>0,05; p=0,280).

Sonuç: RNA dizileme çalışmamız sonucunda ERAP1 geni ifadesi multipl miyeloma hastalarında daha yüksek bulunmasına rağmen, bu çalışmada qRT-PCR ile hasta ve kontrol grupları arasında ERAP1 gen ifadesinde bir farklılık saptanmadı. Ancak bu konuda kesin bir sonuca varabilmek için daha fazla örneklemde bu genin ifadesi araştırılmalıdır. Literatürde farklı kanser türlerinde ERAP1 ifadesi değişkenlik göstermektedir. Ayrıca oldukça polimorfik olan ERAP1 genindeki varyasyonların proteinin fonksiyonuna etkisi olabileceğinden ERAP1'in multipl miyeloma patogenezinde rolünün bu yönüyle de araştırılması gerektiği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: ERAP1, multipl miyeloma, plazma hücre diskrazileri, qRT-PCR

ABSTRACT

Objective: Monoclonal gammopathy of unknown significance (MGUS) is asymptomatic, and multiple myeloma (MM) is a symptomatic plasma cell dyscrasia. In our RNA sequencing study, the expression of the ERAP1 gene from the cell pools of MM patients and healthy bone marrow controls was found to be high in the patient group and it was investigated in this study whether it has a direct or indirect effect on MM pathogenesis.

Method: The expression levels of the ERAP1 gene from the bone marrow materials of 38 newly diagnosed and untreated MM patients, 23 MGUS, and 16 control groups were examined by the qRT-PCR method. The results were analyzed in the SPSS.25 statistics program.

Results: Expression levels of the ERAP1 gene were not statistically significant between the MM group, the MGUS group, and the control group (p>0.05) (p=0.280).

Conclusion: The ERAP1 candidate gene with high RPKM value in our RNA sequencing study did not find a significant relationship between the validated patient and control groups. This issue should be investigated in more samples to reach a definite conclusion. In addition, it was concluded that the polymorphisms of the ERAP1 gene, highly polymorphic, should be studied in this aspect, and its effect on gene expression in myeloma.

Keywords: ERAP1, multiple myeloma, plasma cell dyscrasias, qRT-PCR

Cite as: Sarıman M, Karaçam B, Ayer M, Ekmekci SS, Suer İ, Çefle K, et al. ERAP1 Gen İfadesinin Plazma Hücre Diskrazilerinde İncelenmesi. İKSSTD 2022;14(2):120-124

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Neslihan Abacı, İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Ensitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
E-posta: neslihan.abaci@istanbul.edu.tr **ORCID ID:** 0000-0002-9962-4010

Geliş tarihi/Received: 03.05.2021
Kabul tarihi/Accepted: 06.10.2021

Medical Journal of Istanbul Kanuni Sultan Suleyman published by Kare Publishing. İstanbul Kanuni Sultan Süleyman Tıp Dergisi, Kare Yayıncılık tarafından basılmıştır.
OPEN ACCESS This is an open access article under the CC BY-NC license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

GİRİŞ

Plazma hücre diskrazileri (PHD), kemik iliği plazma hücrelerinin sayısının çoğalmasından kaynaklanan heterojen bir hematolojik malignite grubunu oluşturur. Çoğu hastada tespit edilen paraprotein olarak adlandırılan hastaya özgü bir monoklonal antikor veya hafif zincir ile karakterizedir.[1] PHD'lerin arasında en sık görülen önemi bilinmeyen monoklonal gammopati (MGUS)'dir ve kemik iliğinde plazma hücre infiltrasyonunun %10'un altında olması ve son organ hasarının olmaması ile premalign prekürsör durum olarak tanımlanır.[2] MGUS'un, litik kemik lezyonlarının görüldüğü, paraprotein birikimi, hiperkalsemi ve anemi ile seyreden semptomatik bir PHD olan multipl miyelomaya (MM) dönüştüğü bilinmektedir.[3] MM'nin görülme oranı yaşla birlikte artar bunun için yaşlı nüfusun artış gösterdiği çağımızda miyeloma tanısını koyabilmek etkin tedaviyi sağlamak adına önemlidir.[4] Etkin kürlerin gerçekleştirilip sağkalımın artırılması için özellikle hedefe yönelik tedaviler ve erken tanı biyobelirteçlerinin bulunması miyeloma grubunda oldukça önemlidir.

Endoplazmik retikulum aminopeptidaz 1 (ERAP1)'in ifadesinin, farklı tümörlerde sıklıkla değiştiği bilinmesine rağmen henüz MM'nin patogenezindeki ve progresyonundaki etkisi belirlenmedi. Normal ve neoplastik doku örnekleri karşılaştırıldığında, ERAP1 ve ilgili genlerde malign transformasyon sırasında değişiklikler tespit edildi. Bu değişiklikler sıklıkla ERAP1, ERAP2 ve MHC sınıf I'in düşük ifade edilmesidir. Yumurtalık, meme ve akciğer karsinomlarında ERAP1 ve/veya ERAP2 ifadesinin azaldığı, kolon ve tiroid karsinomlarında ise arttığı gözlendi. Aynı farklılıklar protein seviyelerinde de tespit edildi.[5]

Literatürde yer alan MM transkriptom çalışmamızda miyeloma hastalarında kontrol grubuna göre artmış gen ifadesine sahip ERAP1 geni, miyeloma patogenezinde rol alabilecek aday genlerden biri olarak belirlendi.[6] Çalışmamızda yeni tanılı ve tedavi görmemiş MM hastaları, MGUS grubu ve kontrol grubunda ERAP1 aday geninin mRNA düzeyi qRT-PCR yöntemi ile analiz edilerek, MM patogenezindeki dolaylı ya da doğrudan ilişkisi araştırıldı.

YÖNTEM

Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması

Çalışma için İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alındı (Dosya no: 2017/1425). Helsinki Bildirgesine uygun şekilde gönüllü onam formları imzalatıldı ve çalışma iyi klinik ve laboratuvar uygulamaları esaslarına uygun olarak gerçekleştirildi. Çalışmamıza İstanbul Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hematoloji Bölümü 2018–2020 yılları arasında takibi yapılan yeni tanılı ve ilaç tedavisi almamış 38 MM ve 23 MGUS hastası dahil edildi. Kontrol grubu dokuz sağlıklı kemik iliği donör vericisi ile yedi MGUS olmayan bireyden oluştu. 4 mL (EDTA'lı tüp) kemik iliği materyali alındı.

ERAP1 Gen İfadesinin Belirlenmesi

MM, MGUS ve kontrol örnekleri kemik iliği biyopsisi sonrası bekletilmeden yoğunluğu 1077 g/mL olan Ficol-Histopaque (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) kullanılarak mononükleer hücrelerine ayrıştırıldı. Tanısı kesinleşen örneklerden PureLink RNA Micro kit (Invintrogen, Carlsbad CA, USA)" ile total RNA izolasyonu yapıldı. Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis (Roche, Mannheim, Germany) kiti ile total RNA'dan cDNA sentezi yapıldı. SYBR Green kullanılarak ERAP1 aday geni ve TATA-binding protein housekeeping genine spesifik primerler ile qRT-PCR gerçekleştirildi. MM, MGUS ve kontrol gruplarında ERAP1 geninin ifade seviyesi $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile belirlendi.

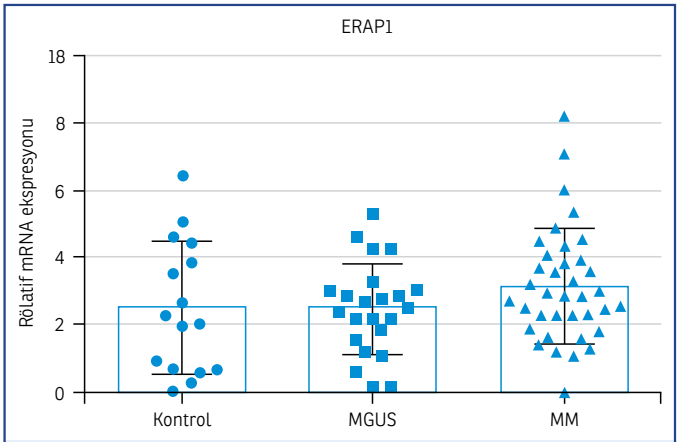
İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizlerde SPSS 25 (IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows. Version 25.0. Armonk. NY: IBM Corp.) kullanıldı. Shapiro-Wilk testi sonucunda normal dağılım göstermedi, bundan dolayı ERAP1 ifade düzeylerini iki grup arasında karşılaştırmak için Mann-Whitney U testi ve üç grup arasında karşılaştırmak için Kruskal Wallis testi kullanıldı. P değeri 0,05'ten küçük bulunduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmamızın demografik bilgileri MM tanısı konulan 27 (%71) erkek ve 11 (%29) kadın birey, MGUS tanısı konulan 10 (%43,5) erkek ve 13 (%56,5) kadın birey ile kontrol grubu olarak 11 (%69) erkek ve 5 (%31) kadın bireyden oluşmaktadır. Kontrol grubu yaş ortalaması 51,1±18,3 yıl idi. MM grubu yaş ortalaması 63,6±11,6 yıl iken, MGUS grubu yaş ortalaması 64,2±13 yıl olarak tespit edildi.

Graph Pad Prism Software (version 6.01) programında ERAP1 geninin rölatif mRNA düzeyi Şekil 1'de gösterildi. ERAP1 geninin mRNA ifadesinin ortalaması ve standart sapmaları MM grubunda 2,459±0,279, MGUS grubunda 3,119±0,27 ve kontrol grubunda 2,482±0,492 olarak belirlendi. Mann-Whitney U testine göre ERAP1 geninin mRNA ifadesi, MM grubu ve kontrol grubu arasında karşılaştırıldığında, MM ve MGUS grubu arasında karşılaştırıldığında ve MGUS ve kontrol grubu arasında karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadığı, p değerleri ile birlikte Tablo 1'de verildi. ERAP1 mRNA ifadesi ile yedi sitogenetik parametrenin p değerleri de Tablo 2'de verildi.



Şekil 1. MM, MGUS ve kontrol gruplarında ERAP1 geni rölatif mRNA ifadesi

ERAP1: Endoplazmik retikulum aminopeptidaz 1, MGUS: Önemi bilinmeyen monoklonal gammopati, MM: Multipl miyeloma

TARTIŞMA

MM, immünglobulin proteininin fazla sentez edildiği ve proteinin yanlış katlanmasıyla ilerleyen, hücresel değişimlerin olduğu bir hastalıktır. Protein homeostazı, normal ve malign plazma hücreleri için çok kritik bir süreç olup ubikitin-proteozom yolağına bağımlıdır.[7]

Hücre içi protein yıkımının son aşamasında yer alan aminopeptidazlar, ubikitin-proteozom yolu tarafından antijen sunumu veya tam hidrolizi için üretilen peptitlerin kırpılmasında görevlidir.[8] Miyelomada aminopeptidazların ifadesi hakkında fazla çalışma bulunmamaktadır. ERAP1 ve ERAP2 aktivitesinin kanserin normal immün kontrolü üzerinde rolü olduğu ve bu iki enzimin solid kanserlere karşı immün yanıtı artırmada farmakolojik hedef olabileceği vurgulanmıştır. Ayrıca ERAP1 ifadesinin solid tümörlerde, tümör hücrelerinin bağışıklıktan kaçması için kritik olabileceği çalışmalarda gösterilmektedir.[9]

ERAP1, insan popülasyonunda oldukça polimorfiktir. Birçok genom boyu ilişkilendirme (GWAS) ve popülasyon çalışmaları, ERAP1'deki tek nükleotit polimorfizmi yani SNP'leri kodlama ile otoimmünite, viral enfeksiyon ve kanser dahil olmak üzere hastalığa yatkınlıkla ilişkilendirmiştir. ERAP1 polimorfizmleri enzimatik aktiviteyi ve antijenik peptitleri üretme veya yok etme kapasitesini etkilemektedir. ERAP1'deki genetik farklılıklar, fonksiyonel enzimatik aktivitede değişikliklere sebep olarak bu durumun bireyler arasında farklı immün yanıta neden olabileceği belirtilmiştir.[10]

ERAP genlerinin ifade ve fonksiyonundaki bozukluklar, melanom, lösemi-lenfomalar, meme, kolon, akciğer, deri, kor-

Tablo 1. ERAP1 mRNA ekspresyonunun gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırılması

Çalışma grupları	Sayı (n)	ERAP1 ifadesi (Ort±SS)	ERAP1 kontrol p değeri[a]	ERAP1 MGUS p değeri[a]	ERAP1 MGUS-MM p değeri[b]
MM	38	2,459±0,279	0,225	0,176	
MGUS	23	3,119±0,27	0,808		
Kontrol	16	2,482±0,492		0,808	0,280

[a]Mann-Whitney U testi; [b]Kruskal Wallis testi. ERAP1: Endoplazmik retikulum aminopeptidaz 1; MGUS: Önemi bilinmeyen monoklonal gammopati; MM: Multipl miyeloma; Ort: Ortalama; SS: Standart sapma

Tablo 2. ERAP1 geni mRNA ekspresyonunun sitogenetik gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırılması

Sitogenetik parametreler	Sayı (n)	ERAP1 p değeri[a]
Trizomi 8		
Pozitif	2	0,653
Negatif	54	
Monozomi 7		
Pozitif	2	0,893
Negatif	54	
t(11;14)(q13;q32)		
Pozitif	4	0,492
Negatif	52	
Del 17p13.1 (p53)		
Pozitif	1	0,787
Negatif	54	
Del 13q14.3 (RB1)		
Pozitif	7	0,860
Negatif	49	
t(4;14) (p16.3;q32)		
Pozitif	2	0,099
Negatif	52	
Karyotip analizi		
Normal	4	0,718
Anormal	51	

[a]Mann-Whitney U testi. ERAP1: Endoplazmik retikulum aminopeptidaz 1

yon, serviks, prostat, böbrek ve mesane dahil olmak üzere çeşitli solid ve hematolojik tümörlerde tespit edilmiştir.[11]

Servikal karsinomda ERAP1'in numunelerin %85'inde yüksek seviyelerde, geri kalan numunelerde düşük seviyelerde ifade edildiği bildirilmiştir. Düşük ERAP1 ifadesi, servikal karsinom hastalarında hem metastazın artmasında hem de

genel olarak sağkalımın azalmasında ilişkili bulunmuştur.[12] Steinbach ve ark.[13] ERAP1'in human papillomavirüs 16 (HPV16)-pozitif servikal karsinom hücre hattında ve serviks kanseri örneklerinde HPV16-negatif örneklere kıyasla fazla sentezlendiğini göstermişlerdir. Bununla birlikte, ERAP1'in spesifik HPV antijenik peptitlerin üretiminde rolü olduğu tespit edilmemiştir. Endometriyal karsinomda, analiz edilen ve CA-125 düzeyleri ile ilişkili bulunan ERAP1 ifadesi, tümör gelişimi ve farklılaşmasında rol oynadığını düşündürmüştür. Özefagus karsinomu lezyonlarında, ERAP1 ifadesi, hastaların %28'inde kaybolmuş veya azalmıştır, tümör invazyonunun derinliği ile anlamlı olarak ilişkilidir. ERAP1'in düşük ifadesi, triple negatif meme karsinomu hastalarının kötü klinik sonuçlarıyla ilişkilendirilmiştir.[11,13]

Çalışmamızda yapılan istatistiksel analiz ile ERAP1 gen ifadesi MM, MGUS ve kontrol grupları arasında anlamlı (p=0,280) bir fark bulunmamıştır. Aynı zamanda ERAP1 geni, mRNA ekspresyonunun sitogenetik grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Transkriptom çalışmamızda ERAP1 ekspresyonunun yüksek bulunması, hasta grubunda miyeloma hücreleri, sağlıklı kontrol grubunda ise B hücrelerinin kemik iliği materyalinden saflaştırılmış ve her grup kendi içinde bir hücre havuzu yapılarak çalışılmış olmasından kaynaklanabilir. Literatüre göre ERAP gen ailesinde bulunan SNP'ler çeşitli hastalıklarda enzimatik aktivite veya gen ifadesindeki değişikliklere sebep olmaktadır. İleriki çalışmalarımızda hasta ve kontrol gruplarımızda ERAP1 polimorfizmlerinin taranması hedeflenmektedir. Sonuç olarak çalışmamızda, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasına rağmen MM patogenezinde ERAP1'in rolünün belirlenmesi için bu polimorfik varyantların da araştırılmasının önemli olduğu düşünülmektedir.

Ethics Committee Approval: The study was approved by the Istanbul University Istanbul Faculty of Medicine Clinical Research Ethics Committee (No: 2017/1425, Date: 22/12/2017).

Peer-review: Externally peer reviewed.

Authorship Contributions: Concept: N.A., M.S.; Design: N.A., S.S.E.; Supervision: N.A.; Funding: N.A.; Materials: M.A., Ş.P., Ş.Ö., K.Ç., M.N., N.A.; Data Collection or Processing: M.S., İ.S., B.K.; Analysis or Interpretation: N.A., S.S.E., M.S.; Literature Search: Ş.P., Ş.Ö., K.Ç., M.A., M.N., M.S., İ.S., B.K., S.S.E., N.A.; Writing: M.S., S.S.E., N.A.; Critical review: Ş.P., Ş.Ö., K.Ç., M.A., M.N., M.S., İ.S., B.K., S.S.E., N.A.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects (SRP) Coordination Unit (Project No: 30846).

Etik Kurul Onayı: Çalışma İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı (Numara: 2017/1425, Tarih: 22/12/2017).

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları: Konsept: N.A., M.S.; Dizayn: N.A., S.S.E.; Denetmeler: N.A.; Kaynaklar: N.A.; Malzemeler: M.A., Ş.P., Ş.Ö., K.Ç., M.N., N.A.; Veri Toplama veya İşleme: M.S., İ.S., B.K.; Analiz veya Yorumlama: N.A., S.S.E., M.S.; Literatür Arama: Ş.P., Ş.Ö., K.Ç., M.A., M.N., M.S., İ.S., B.K., S.S.E., N.A.; Yazan: M.S., S.S.E., N.A.; Eleştirel İnceleme: Ş.P., Ş.Ö., K.Ç., M.A., M.N., M.S., İ.S., B.K., S.S.E., N.A.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 30846).

KAYNAKLAR

1. Lum EL, Bunnapradist S. Current opinions in nephrology and hypertension: Kidney transplantation in patients with plasma cell dyscrasias. Curr Opin Nephrol Hypertens 2019;28:573–80.
2. Rossi A, Voigtlaender M, Janjetovic S, Thiele B, Alawi M, März M, et al. Mutational landscape reflects the biological continuum of plasma cell dyscrasias. Blood Cancer J 2017;7:e537.
3. Soh KT, Tario JD Jr, Wallace PK. Diagnosis of plasma cell dyscrasias and monitoring of minimal residual disease by multiparametric flow cytometry. Clin Lab Med 2017;37:821–53.
4. Gavriatopoulou M, Fotiou D, Ntanasis-Stathopoulos I, Kastritis E, Terpos E, Dimopoulos MA. How I treat elderly patients with plasma cell dyscrasias. Aging (Albany NY) 2018;10:4248–68.
5. Leone P, Shin EC, Perosa F, Vacca A, Dammacco F, Racanelli V. MHC class I antigen processing and presenting machinery: Organization, function, and defects in tumor cells. J Natl Cancer Inst 2013;105:1172–87.
6. Sarıman M, Abacı N, Sırma Ekmekçi S, Çakiris A, Perçin Paçal F, Üstek D, et al. Investigation of gene expressions of myeloma cells in the bone marrow of multiple myeloma patients by transcriptome analysis. Balkan Med J 2019;36:23–31.
7. Ri M. Mechanism of action and determinants of sensitivity to the proteasome inhibitor bortezomib in multiple myeloma therapy. Rinsho Ketsueki 2016;57:537–45. [Article in Japanese]
8. Moore HE, Davenport EL, Smith EM, Muralikrishnan S, Dunlop AS, Walker BA, et al. Aminopeptidase inhibition as a targeted treatment strategy in myeloma. Mol Cancer Ther 2009;8:762–70.
9. Stratikos E, Stamogiannos A, Zervoudi E, Fruci D. A role for naturally occurring alleles of endoplasmic reticulum aminopeptidases in tumor immunity and cancer pre-disposition. Front Oncol 2014;4:363.
10. Koumantou D, Barnea E, Martin-Esteban A, Maben Z, Papakyriakou A, Mpakali A, et al. Editing the immunopeptidome of melanoma cells

using a potent inhibitor of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1). Cancer Immu nol Immunother 2019;68:1245–61.

11. Compagnone M, Cifaldi L, Fruci D. Regulation of ERAP1 and ERAP2 genes and their disfunction in human cancer. Hum Immunol 2019;80:318–24.
12. Mehta AM, Jordanova ES, Kenter GG, Ferrone S, Fleuren GJ. Association of antigen processing machinery and HLA class I defects with clinicopathological outcome in cervical carcinoma. Cancer Immunol Immunother 2008;57:197–206.
13. Steinbach A, Winter J, Reuschenbach M, Blatnik R, Klevenz A, Bertrand M, et al. ERAP1 overexpression in HPV-induced malignancies: A possible novel immune evasion mechanism. Oncoimmunology 2017;6:e1336594.