

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DEK GEN İFADESİNİN MULTIPLE MİYELOM HÜCRELERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ZİHNİ ONUR ÇALIŞKANER
DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2018

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DEK GEN İFADESİNİN MULTIPLE MİYELOM
HÜCRELERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ZİHNİ ONUR ÇALIŞKANER
DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
DOÇ. DR. AYTEN KANDİLCİ

GEBZE
2018

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**INVESTIGATING EFFECTS OF DEK GENE
EXPRESSION ON MULTIPLE MYELOMA
CELLS**

ZİHNİ ONUR ÇALIŞKANER
A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
ASSOC. PROF. DR. AYTEN KANDİLCİ

GEBZE

2018

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 03/10/2018 tarih ve 2018/50 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 12/10/2018 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Zihni Onur ÇALIŞKANER'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI)

: Doç. Dr. Ayten KANDİLCİ

A. Kandilci

ÜYE

: Prof. Dr. Uygur H. TAZEBAY

Uygur H. Tazebay

ÜYE

: Prof. Dr. Müge SAYITOĞLU

Müge Sayitoğlu

ÜYE

: Doç. Dr. Naci ÇİNE

Naci Çine

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Can M. ERİŞTİ

Can M. Erişti

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

ÖZET

Multiple miyelom (MM), antikor üreten plazma hücrelerinin kanseridir. *DEK* geni, MM hastalarının yaklaşık %16'sında amplifikasyon gözlenen 6p22.3 kromozom bölgesinde bulunmaktadır. Bazı epitelyal kanserlerde kromozomal amplifikasyonlarla *DEK*'in ifadesinde artış meydana gelmektedir ancak bu durumun MM için geçerli olup olmadığı bilinmemektedir. İlk olarak laboratuvarımızda MM hastalarında *DEK* geninin kopya sayısı araştırılmış ve hastaların yaklaşık %10'unda *DEK* geninde amplifikasyon tespit edilmesine rağmen, bu hastalarda *DEK* mRNA ifadesinde artış görülmediği; *DEK* ifadesinin normal ve kanserli plazma hücrelerinde 2 ile 30 kat azaldığı tespit edilmiştir. Bu doktora tezi kapsamında, MM hücrelerinin (RPMI-8226 ve U266) biyolojik özelliklerinin *DEK* ifadesindeki artış veya azalmadan nasıl etkilendiği, hücrelerdeki *DEK* ifadesi lentiviral shRNA'lar ile susturularak ya da retroviral transdüksiyonla aşırı *DEK* ifadesi sağlanarak araştırılmıştır.

DEK ifadesinin kalıcı olarak susturulduğu RPMI-8226 hücrelerinde, plazma hücresi belirteci olan CD138'in mRNA ifadesinde kontrole oranla 2 katlık artış olduğu belirlenmiştir. İmmunositokimyasal boyama ve akım sitometrisi analizleri *CD138* ifadesindeki bu artışın protein seviyesinde de gerçekleştiğini göstermiştir. *DEK*'in aşırı ifade edildiği MM hücrelerinin proliferasyonunda kontrol hücrelerine göre belirgin bir fark görülmemiştir, ancak *DEK*'e özgün shRNA'lardan birinin RPMI-8226 hücrelerinin bölünme sürelerinde 15 saatlik uzamaya sebep olduğu gözlenmiştir. Kemoterapötik ilaç olan melphalan MM hücre hatlarının canlılıklarında düşüşe ve hücre döngüsünde tutuluma neden olsa da, *DEK* ifadesindeki kalıcı artış veya azalışın bu durumu değiştirmedeği saptanmıştır. Bu tez kapsamında ilk defa *DEK* ifadesinin MM hücre hatlarının biyolojisi üzerindeki etkileri araştırılmış ve elde edilen sonuçlar *DEK*'in özellikle plazma hücresi farklılaşmasındaki olası rollerinin araştırılmasını sağlayacak projeler üretilmesi için temel oluşturmuştur. Doktora tez çalışması TUBİTAK-1001 (KBAG 212T108) projesi ile desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Multiple Miyelom, *DEK*, CD138, RPMI-8226, U266.

SUMMARY

Multiple myeloma (MM) is a hematological cancer resulting in invasion of bone marrow by rapidly proliferating plasma cells. *DEK* is one of the genes locating on 6p22.3 chromosomal region, which is amplified in approximately 16% of MM patients. *DEK* expression is increased in certain hematological and solid cancers and this increase is associated with malign transformation of epithelial cells. We showed previously that increase in the copy number of *DEK* gene, which was observed in about 10% of the analyzed patients, doesn't increase the expression level of *DEK* mRNA or protein in CD138-positive MM cells, which is opposite to carcinomas. In this PhD thesis, *DEK* expression was stably knocked down by two different lentiviral shRNAs (shDEK-B, shDEK-C) and overexpressed by retroviral vectors (MSCV-*DEK*-IRES-GFP) in order to investigate the effects of modified *DEK* expression on biology of MM cell lines.

While any difference in proliferation capacity of *DEK* overexpressing RPMI-8226 and U266 cells was not detected, there was a 15-hour prolongation in doubling time of RPMI-8226-shDEK-C cells. Melphalan sensitivity of the *DEK* overexpressing or *DEK*-knockdown cells was not changed profoundly. Interestingly, RT-qPCR analysis revealed 2-fold increase in expression level of plasma cell marker CD138 in *DEK*-knockdown RPMI-8226 cells compared to control cells. Immunocytochemistry and FACS analysis confirmed a moderate increase in expression of CD138. Effects of *DEK* expression on MM cell biology was evaluated first time in this doctorate thesis and our results provide a basis for future projects that aim to investigate potential roles of *DEK* in plasma cell development. This thesis study was supported by TUBITAK grant KBAG 212T108.

Keywords: Multiple Myeloma, *DEK*, CD138, RPMI-8226, U266.

TEŞEKKÜR

Bu doktora tezinin ortaya çıkmasında, yürütülmesinde ve sonuçlandırılmasında değerli katkılarını; akademik ve sosyal hayattaki desteklerini ve yol gösterici fikirlerini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Ayten KANDİLCİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora sürecimin başından sonuna kadar birlikte çalıştığımız, emeğini, fikirlerini, desteklerini ve dostluklarını esirgemeyen değerli ekip arkadaşlarım Türkan ÇAKAR, Emrah ÖZÇELİK ve Abdullah Abdul Waheed'e; gerektiğinde desteklerini esirgemeyen Özge ARSLAN, Merve T. ÖZTÜRK, Ömer GÜLLÜLÜ ile Eda, Sinem, Çiğdem, Gamze, İlkay ve Kübra'ya; son olarak güzel anları paylaştığım ve yardımlarını esirgemeyen tüm MBG ailesine sonsuz teşekkür ederim.

Beni bugünlere getirmek için maddi-manevi emeklerini ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, karşılaştığım her türlü zorlukta ve ihtiyacım olan her anda yanımda olan canım aileme ve yakın dostlarıma en içten minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Varlıklarıyla hayatımı güzelleştiren ve şenlendiren sevgili yeğenlerim Deniz ve Emir Asaf'a; minicik elleri ve en içten gözleriyle gönlümü şenlendiren, hayatıma ayrı bir neşe ve anlam katan biricik kızım İpek Beyza'ya; sevgisinden ve varlığından destek aldığım, iyi ve kötü her anımda sabırla yanımda olan, hayat arkadaşım Özlem ÇALIŞKANER'e sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. HEMATOPOETİK SİSTEM VE HEMATOPOEZ	3
3. B LENFOSİTLERİ	5
3.1. Kemik İliğinde Erken B Lenfosit Gelişimi	5
3.1.1. İmmünoglobulin Gen Düzenlenmesi	6
3.1.2. Oto-Reaktif B Lenfositlerinin Elenmesi	7
3.1.3. B Lenfositlerinin Aktivasyonu	8
4. PLAZMA HÜCRESİ	12
4.1. Plazma Hücresinin Gelişimi	12
4.1.1. Plazma Hücre Gelişiminin Transkripsiyonel Kontrolü	14
4.2. Plazma Hücre Gelişiminde ve Sağ Kalımında Rol Oynayan Faktörler	18
4.2.1. Sitokinler	19
4.2.2. İnterferonlar	21
4.2.3. Kemokinler	21
4.2.4. Hücre-Hücre Etkileşimleri	22
4.3. Plazma Hücresinin İmmünofenotiplendirilmesi	23
4.3.1. CD138 (Syndecan-1)	25
4.4. B Lenfosit ve Plazma Hücre Kökenli Kanserler	26
5. MULTİPLE MİYELOM	28
5.1. MM Epidemiyolojisi	28
5.2. MM Gelişim Evreleri ve Teşhisi	29
5.3. MM Patogenezi ve Moleküler Mekanizmalar	31

5.3.1. Kalıtılmış Genetik Değişiklikler	33
5.3.2. Kromozom Translokasyonları	34
5.3.3. Nokta Mutasyonları	35
5.3.4. Kromozom Kopya Sayısı Anomalileri	35
5.4. MM Tedavisi	37
6. DEK PROTEİNİ	40
6.1. DEK Proteininin Yapısı ve Lokalizasyonu	40
6.2. DEK Aktivitesinin Düzenlenmesi	42
6.2.1. Transkripsiyonel Kontrol	42
6.2.2. Translasyon Sonrası Modifikasyonlar	43
6.3. DEK'in Hücresel İşlevleri	44
6.3.1. DNA Topolojisi ve Kromatin Yapısının Değiştirilmesi	44
6.3.2. Transkripsiyon Kontrolü	45
6.3.3. DNA Onarımı ve Hücre Ölümü	46
6.3.4. Hücre Dışına Salgılanan DEK ve Kemoatraksiyon	46
6.4. DEK'in Hematopoezdeki Rolü	47
6.5. DEK ve Kanser İlişkisi	48
6.6. DEK ve Multiple Miyelom İlişkisi	52
7. MATERYAL	53
8. YÖNTEM	56
8.1. Hücre Kültürü	56
8.2. MM Hücre Hatlarına Gen Aktarımı	56
8.2.1. Viral Vektörlerin Paketleme Hücre Hattına Transfeksiyonu	57
8.2.2. Viral Transdüksiyon	58
8.3. GFP ^{pozitif} Hücrelerin FACS ile Ayrıştırılması	59
8.4. RT-qPCR	59
8.4.1. Total RNA İzolasyonu	59
8.4.2. cDNA Sentezi (Ters Transkripsiyon)	60
8.4.3. Eş Zamanlı Kantitatif PCR (qPCR)	60
8.5. Western Blot Yöntemi ile Protein Analizi	62
8.5.1. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini	62
8.5.2. SDS-PAGE ve Western Blot	63
8.6. Proliferasyon Analizi	64
8.7. Melphalan Toksisitesi Analizi	65

8.8. Hücre Döngüsü Analizi	65
8.9. Giemsa Boyama	66
8.10. İmmünotokimyasal (ICC) Yöntem ile CD138 Tespiti	66
8.11. İmmünfloresan (IF) Boyama	66
8.12. Akım Sitometrisi ile CD138 Analizi	67
8.13. Hücre Adezyon Deneyi	67
8.14. Verilerin İstatistiksel Analizi	68
9. BULGULAR	69
9.1. MM Hücre Hatlarında DEK İfadesinin Manipülasyonu	69
9.2. DEK Ekspresyonunun Doğrulanması	70
9.2.1. mRNA Seviyesinde Doğrulama	70
9.2.2. Protein Düzeyinde Doğrulama	72
9.3. DEK İfadesi Modifiye Edilen MM Hücre Hatlarının Çoğalma Kapasitesi ve Bölünme Sürelerinin Belirlenmesi	72
9.4. DEK İfadesi Modifiye Edilen MM Hücre Hatlarının Melphalan Hassasiyetinin Belirlenmesi	75
9.5. Hücre Döngüsü Analizi	78
9.6. Giemsa Boyama ile Hücre Morfolojilerinin Karşılaştırılması	81
9.7. CD138 Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi	82
9.7.1. RT-qPCR ile CD138 Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi	82
9.7.2. ICC ve IF Yöntemleriyle CD138 Protein Varlığı ve Lokalizasyonunun Tespiti	83
9.7.3. Akım Sitometrisi ile CD138 Analizi	85
9.8. Hücre Adezyon Deneyi	87
10. SONUÇLAR	88
KAYNAKLAR	93
ÖZGEÇMİŞ	113
EKLER	114

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Açıklamalar</u>
<u>Kısaltmalar</u>	
ACTB	: Actin-Beta
AID	: Activation-İnduced Cytidine Deaminase
AML	: Akut Myeloid Lösemi
B220	: Receptor-Type Tyrosine-Protein Phosphotase C
BACH2	: Transcription Regulator Protein BACH2
BCL6	: B-Cell Lymphoma 6 Protein
BCMA	: B-Cell Maturation Protein
BCR	: B Hücresi Reseptörü
BLIMP1	: B-Lymphocyte-İnduced Maturation Protein 1
BMSCs	: Bone Marrow Stromal Cells
BSA	: Bovine Serum Albumin
CD19	: B-Lymphocyte Antigen CD19
CD21	: Complement Receptor Type 2
CD22	: B-Cell Receptor CD22
CD38	: ADP-Ribosyl Cyclase 1
CDKN1A	: Cyclin-Dependent Kinase İnhibitor 1
CLP	: Common Lymphoid Progenitor
CMP	: Common Myeloid Progenitor
CO ₂	: Karbondioksit
CSR	: Class Switch Recombination
CXCL12	: Stromal-Cell-Derived Factor 1
CXCR4	: C-X-C Chemokine Receptor Type 4
D	: Çeşitli (Diverse)
DEXA	: Dual Energy X-Ray
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
E2F1	: Transcription Factor E2F1
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic Acid

EMP	: Extramedullary Plasmactomas
ER	: Endoplazmik Retikulum
FACS	: Fluorescence-Activated Cell Sorting
FBS	: Fetal Bovine Serum
FLC	: Serumda İmmunoglobülin Serbest Zincirleri
GFP	: Green Flourescent Protein
GM	: Germinal Merkez
H	: Ağır (Heavy)
H ₂ O	: Su
HKH	: Hematopoetik Kök Hücre
Ig	: İmmünoglobülin
IGF-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL-3	: İnterlökin-3
IL-4	: İnterlökin-4
IL-5	: İnterlökin-5
IL-6	: İnterlökin-6
IL-10	: İnterlökin-10
IMiDs	: İmmüno Modölator İlaçlar
IRE1	: Endoplasmic Reticulum To Nucleus Signaling 1
IRF4	: İnterferon Regulatory Factor 4
J	: Katılım (Joining)
kDa	: Kilodalton
L	: Hafif (Light)
MCL1	: İnduced Myeloid Leukemia Cell Differentiation Protein Mcl-1
MGUS	: Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance
MHC	: Major Histocompatibility Complex
ml	: Mililitre
MM	: Multiple Miyelom
MÖH	: Multipotent Öncü Hücreler
mRNA	: Mesajcı Ribonökleik Asit
MUC-1	: Mucin-1
MYC	: Myc Proto-onkogen Proteini
MZ	: Marjinal Zon

NCI	:	Uluslararası Kansere Enstitüsü
NF- κ B	:	Nükleer Faktör Kappa B
NK	:	Doğal Öldürücü Hücreler
OBF1	:	OCT-Binding Factor 1
OCT	:	Octamer-Binding Transcription Factor
PAX5	:	Paired Box Protein 5
PBS	:	Phosphate Buffered Saline
PCA-1	:	Plasma Cell membrane Glycoprotein PC-1
PCL	:	Plazma Hücreli Lösemi
PDGF	:	Platelet-Derived Growth Factor
RAG	:	Recombination-Activating Gene
Rb	:	Retinoblastoma
RNA	:	Ribonükleik Asit
RT-qPCR	:	Real Time Polymerase Chain Reaction
SHM	:	Somatik Hipermutasyon
shRNA	:	Short Hairpin RNA
SLC	:	Surrogate L Chains
SLE	:	Systemic Lupus Erythematosus
SMM	:	Smouldering Multiple Myeloma
SPB	:	Solitary Plasmacytomas
TBS	:	Tris Buffered Saline
TLR	:	Toll-Like Receptor
TNF	:	Tumor Necrosis Factor
TNFSF13/APRIL	:	Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily Member 13
UPR	:	Unfolded Protein Response
V	:	Değişken (Variable)
VCAM-1	:	Vascular Cell Adhesion Protein 1
VEGF	:	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
VLA-4	:	Very Late Antigen 4
XPB1	:	X-Box-Binding Protein 1

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Hematopoezin hiyerarşik yapısının şematik gösterimi.	4
3.1: B hücre gelişim safhalarının şematik gösterimi.	6
3.2: B hücre gelişimine paralel olarak immünoglobülin genlerinde meydana gelen genetik düzenlemeler.	7
3.3: Geçici B hücrelerinin MZ ve FO B hücrelerine farklılaşması.	9
3.4: B lenfositlerinin TH hücreleri aracılığıyla aktivasyonu.	10
3.5: B lenfositlerinin T hücrelerinden bağımsız aktivasyonu.	11
4.1: Plazma hücrelerinin germinal merkezdeki gelişim evreleri.	13
4.2: B lenfositleri ve plazma hücrelerindeki transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon seviyelerinin gösterilmesi.	14
4.3: Farklı hücre karakterlerinin ortaya çıkmasında rol oynayan transkripsiyon faktörlerinin birbirleri üzerindeki düzenleyici etkileri.	16
4.4: B hücre ve plazma hücre gelişiminde rol oynayan faktörler ve işlevleri.	17
4.5: Plazma hücre gelişimi ve sağ kalımında rol oynayan çevresel faktörler.	18
4.6: CXCL12'nin, özgün yüzey reseptörü CXCR4'e bağlanması sonucu aktive olan hücre içi sinyal yolları.	22
4.7: Stroma hücresi ve plazma hücresi arasında farklı adezyon molekülleri vasıtasıyla gerçekleşen hücreler arası etkileşimler.	23
4.8: Farklı yüzey belirteçleri taşıyan plazma hücre popülasyonlarının immünofenotipik özellikleri.	24
4.9: Plazma hücresine ait Giemsa boyama sonrası ışık mikroskobu (solda) ve elektron mikroskop (sağda) görüntüleri.	25
4.10: B lenfositlerinin farklılaşması sırasında ortaya çıkan B/plazma hücre kaynaklı hematolojik kanserler ve hücre kökenleri.	27
5.1: 2012 yılına ait MM insidansının dünya genelindeki dağılımının haritalanması.	29
5.2: MM seyri boyunca hastalığın seviyesine bağlı olarak ortaya çıkan klinik belirtiler.	31
5.3: MM patogenizi sırasında hücre heterojenitesine neden olan	33

mekanizmalar.

5.4:	MM tedavisinde kullanılan ilaçların kategorilendirilmesi ve klinikte kullanımı ile ilgili zaman çizelgesi.	38
5.5:	Melphalan aracılığıyla gerçekleşen alkilasyonun kimyasal gösterimi.	39
6.1:	DEK'in yapısında bulunan fonksiyonel alt birimlerin protein üzerindeki yerleşimlerinin gösterilmesi.	41
6.2:	DEK'in kromozomal lokasyonu, yapısı ve fonksiyonlarının şematik özeti.	48
8.1:	Bio-Rad transfer kasetinin hazırlanması.	63
9.1:	FACS ile ayrıştırılarak kültürlerine devam edilen hücre hatlarının GFP ^{pozitif} hücre oranlarının belirlenmesi.	69
9.2:	Total RNA örneklerine ait agaroz jel görüntüsü.	71
9.3:	RPMI-8226 hücrelerinde DEK ifadesindeki baskılanmanın (A) ve RPMI-8266 hücreleri (B) ile U266 hücrelerinde (C) aşırı DEK ifadesinin mRNA düzeyinde RT-qPCR yöntemiyle doğrulanması.	71
9.4:	Knock-down yapılan RPMI-8226 hücreleri ile aşırı DEK ifadesi yapılan RPMI-8226 ve U266 hücrelerinde DEK ifadesindeki baskılanmanın ve aşırı ifadenin protein düzeyinde doğrulanması.	72
9.5:	Endojen DEK ifadesindeki baskılanmanın RPMI-8226 hücrelerinin büyüme eğrileri üzerindeki etkisi.	73
9.6:	Aşırı DEK ekspresyonunun RPMI-8226 (A) ve U266 (B) hücrelerinin büyüme eğrileri üzerindeki etkisi.	73
9.7:	Endojen DEK ifadesindeki baskılanmanın RPMI-8226 hücrelerinin bölünme süreleri üzerindeki etkisi.	74
9.8:	Ektopik DEK ekspresyonunun RPMI-8226 (A) ve U266 (B) hücrelerinin bölünme süreleri üzerindeki etkisi.	74
9.9:	10 µM melphalan ile muamele edilen DEK ifadesi susturulan ve kontrol RPMI-8226 hücrelerinin büyüme eğrileri (A) ve canlılıklarına (B) ait grafik.	75
9.10:	20 µM melphalan ile muamele edilen DEK ifadesi susturulan ve kontrol RPMI-8226 hücrelerinin büyüme eğrileri (A) ve canlılıklarına (B) ait grafik.	76
9.11:	10 µM ve 20 µM Melphalan ile muamele edilen RPMI-8226	77

	hücrelerine ait büyüme eğrileri (A, C) ve % canlılık oranları (B, D).	
9.12:	10 μ M ve 20 μ M Melphalan ile muamele edilen U266 hücrelerine ait büyüme eğrileri (A, C) ve % canlılık oranları (B, D).	77
9.13:	Melphalan ile muamele edilen ve <i>DEK</i> gen ifadesi baskılanan RPMI-8226 hücrelerinin 48. saat (A) ve 72. saatteki (B) hücre döngüsü histogramları.	79
9.14:	Melphalan ile muamele edilen ve <i>DEK</i> 'i aşırı ifade eden RPMI-8226 hücrelerinin 48. ve 72. saatteki hücre döngüsü histogramları.	80
9.15:	Melphalan ile muamele edilen ve <i>DEK</i> 'i aşırı ifade eden U266 hücrelerinin 48. ve 72. saatteki hücre döngüsü histogramları.	81
9.16:	Giemsa ile boyanan infekte olmamış RPMI-8226 (A), sh-Negative (B), sh <i>DEK</i> -B (C) ve sh <i>DEK</i> -C (D) hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri.	82
9.17:	<i>DEK</i> geni susturulan (A) ve aşırı ifade ettirilen (B) RPMI-8226 hücrelerinde <i>DEK</i> ve <i>CD138</i> mRNA seviyelerinin karşılaştırmalı analizi.	83
9.18:	RPMI-8226 hücrelerinin 20X ışık mikroskobu ile çekilmiş IF boyama görüntüleri.	84
9.19:	<i>DEK</i> geni susturulan RPMI-8226 hücrelerine ait ICC boyaması görüntüleri.	85
9.20:	<i>DEK</i> geni susturulan (A) ve aşırı ifade ettirilen (B) RPMI-8226 hücrelerinin yüzeyinde ifade edilen <i>CD138</i> miktarının (<i>CD138</i> -PE MFI) karşılaştırmalı analizi.	86
9.21:	<i>DEK</i> ekspresyonu modifiye edilen RPMI-8226 hücrelerinin adezyon oranlarının (%) belirlenmesi.	87

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
7.1: Hücre hatları.	53
7.2: Plazmitler.	53
7.3: Taqman Primer-Prob Setleri.	53
7.4: Antikorlar.	53
7.5: Kitler, Kimyasallar.	53
7.6: Cam, Plastik ve Sarf Malzemeler.	55
7.7: Cihazlar.	55
8.1: 293T hücrelerinin transfeksiyonu için hazırlanan plazmid karışımları.	58
8.2: cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı.	60
8.3: cDNA sentezi için kullanılan termal PCR şartları.	60
8.4: Eş zamanlı kantitatif PCR için kullanılan reaksiyon karışımı.	61
8.5: Eş zamanlı kantitatif PCR için kullanılan termal koşullar.	61
8.6: RIPA tamponu içeriği.	62
8.7: Western Blot'ta kullanılan antikor sulandırım oranları, inkübasyon sıcaklıkları ve süreleri.	64
9.1: FACS ile elde edilen RPMI-8226 ve U266 hücre popülasyonları.	70
9.2: İzole edilen RNA örneklerinin spektrofotometrik analizi.	70
B1.1 Telif hakkı bulunan şekiller için alınan izinler.	114

1. GİRİŞ

Multiple Miyelom (MM), habis plazma hücrelerinin anormal olarak çoğalması ve kemik iliğini istilası ile sonuçlanan, genetik olarak oldukça karmaşık bir tümördür [Kuehl and Bergsagel, 2002]. Amerika’da tüm kanser ölümlerinin %2’sini, hematolojik kanserlerden kaynaklanan ölümlerinse yaklaşık %20’sini oluşturmaktadır [Agarwal and Ghobrial, 2013]. Kromozomal delesyonlar, nokta mutasyonları, translokasyonlar ve 6p22.3, 1q gibi bazı kromozom bölgelerinde meydana gelen kopya sayısı artışları MM hastalarında sıklıkla rastlanan genetik değişiklikler arasında yer almaktadır [Chapman et al., 2011].

MM hastalarının %16,6’sında kopya sayısında artış olduğu tespit edilen 6p22.3 bölgesinde yer alan yaklaşık 600 genden biri, türler arasında korunmuş olan *DEK* genidir ve 375 amino asitlik (yaklaşık 45 kDa) nüklear bir protein kodlamaktadır [Riveiro-Falkenbach and Soengas, 2010]. *DEK*’in farklı hücre tiplerinde farklı fonksiyonlara sahip olduğu gösterilmiştir. Kromozom topolojisi ve yapısının modifikasyonu, mRNA kırılması, transkripsiyonun pozitif veya negatif regülasyonu, DNA hasar tamiri, replikasyon kontrolü ve miyeloid hücre farklılaşması *DEK*’in bilinen önemli işlevlerindendir [Alexiadis et al., 2000], [Kavanaugh et al., 2011]. Bununla birlikte *DEK* geni kopya sayısında ve/veya ifadesinde AML, CLL, retinablastom, hepatoselülerkarsinom gibi bazı kanserlerde artış olduğu ve melanom, meme kanseri gibi bazı kanserlerde *DEK*’in onkogen fonksiyonu görerek habis transformasyona neden olduğu bildirilmiştir [Khodadoust et al., 2009], [Privette Vinnedge et al., 2015], [Riveiro-Falkenbach and Soengas, 2010].

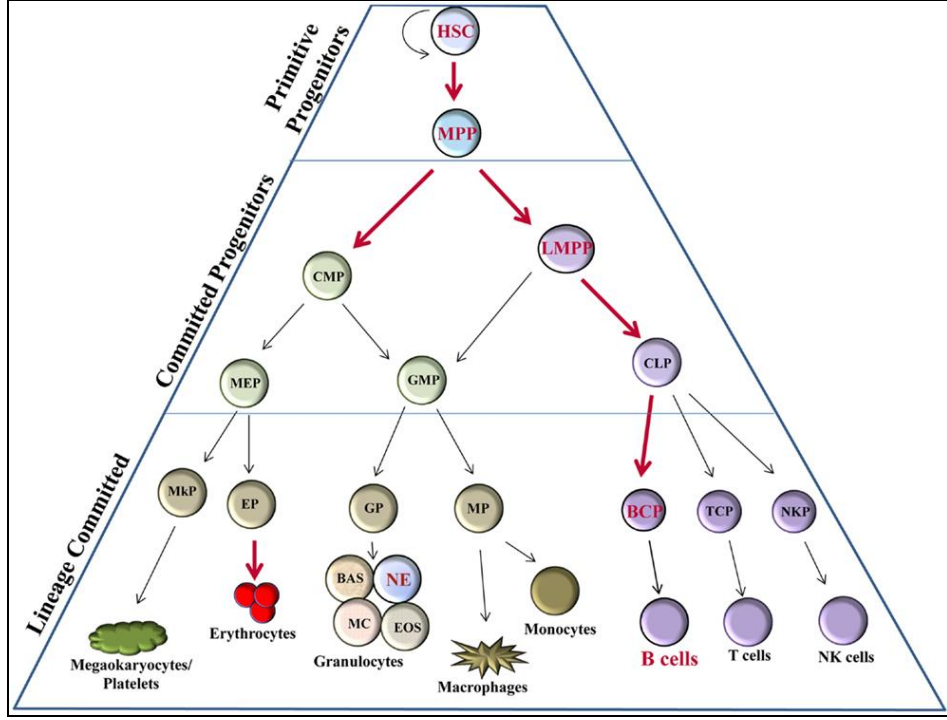
Yukarıda bahsedildiği üzere, MM vakalarının yaklaşık %16’sında 6p22.3 kromozom bölgesinde tespit edilen kopya sayısındaki artışın *DEK* geninin kopya sayısını ve ekspresyonunu nasıl etkilediğine ve *DEK*-MM ilişkisine dair literatür bilgisi bulunmamaktadır. *DEK*’in önemli biyolojik süreçlerdeki ve hematopoetik sistemdeki işlevlerine ek olarak ALL, CLL gibi hematopoetik kanserlerin yanı sıra bazı solid tümörlerde onkogenik özelliklere sahip olması verilerine dayanarak, *DEK* geninin ifadesinde oluşacak değişikliklerin MM hücrelerinin biyolojisi (çoğalma, canlılık vb.) üzerinde etkili olabileceği düşünülmüştür. Bu hipotezi test etmek amacıyla laboratuvarımızda yürütülen yüksek lisans tez çalışmaları kapsamında ilk olarak MM hastalarında *DEK* geninin ekspresyon seviyesi analiz edildi ve gerek

normal gerekse kanserli plazma hücrelerinde (MM hücrelerinde) *DEK* ifadesinin (mRNA ve protein) kontrol kemik iliği hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede azaldığı tespit edildi [Çakar, 2014], [Özdilek, 2013]. Bu çalışmaların devamı olarak, tamamlanan bu doktora tezi kapsamında, *DEK* ekspresyonundaki artış ya da azalmanın MM hücre hatlarının (RPMI-8226 ve U266) çoğalma, canlılık ve kemoterapiye cevaba olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla, MM hücre hatlarında endojen *DEK* ekspresyonu lentiviral sh-RNA aracılığıyla susturuldu veya retroviral vektörler kullanılarak *DEK*'in aşırı ifadesi sağlanmıştır. *DEK* ekspresyonu modifiye edilmiş olan bu hücre hatlarının çoğalması, canlılığı, melphalan hassasiyeti ve plazma hücresi yüzey belirteci olan *CD138* ifadesinde meydana gelen değişimler test edilmiştir. Elde edilen veriler literatürde konuyla ilgili boşluğu doldurarak *DEK* ekspresyonunun MM hücre hatlarının temel biyolojik özellikleri üzerindeki etkilerini ortaya koymuştur. Tamamlanan doktora tez çalışması TÜBİTAK KBAG 212T108 ve GTÜ BAP 2015-A-14 nolu projeler ile desteklenmiştir. Tez kapsamında elde edilen veriler 30 Mayıs 2017 tarihinde *PLOS ONE* dergisinde yayınlanan “*DEK* Protein Level is a Biomarker of *CD138*^{positive} Normal and Malignant Plasma Cells” başlıklı makale ile literatüre kazandırılmıştır [Caliskaner et al., 2017].

2. HEMATOPOETİK SİSTEM VE HEMATOPOEZ

Kan, plazma ve şekilli elemanlardan (kan hücreleri) oluşmuş kendini yenileme kapasitesi oldukça yüksek bir dokudur. Su, proteinler ve küçük moleküller plazmayı meydana getirirken, kırmızı kan hücreleri (red blood cells, RBCs), beyaz kan hücreleri (white blood cells, WBCs) ve trombositler (platelet) kanın şekilli elemanlarını oluşturmaktadır. Kan sisteminin (hematopoetik sistem) devamlılığı ve yenilenmesi için sağlıklı bir insan vücudunda günde yaklaşık 10^{12} kan hücresi üretilmektedir [Doulatov et al., 2012], [Smith, 2003]. “Hematopoez” olarak adlandırılan bu biyolojik süreç, kemik iliğinde bulunan multipotent özellikteki hematopoetik kök hücrelerin (HKH, HSC) hiyerarşik olarak farklılaşması sonucu özelleşmiş işlevlere sahip farklı kan hücrelerinin üretilmesi ile sonuçlanmaktadır [Warr et al., 2011]. Hematopoetik kök hücrelerden meydana gelen multipotent öncül hücreler (multipotent progenitor cells, MPP), bölünerek daha az farklılaşma kapasitesine sahip genel miyeloid öncül hücreler (CMPs) ve genel lenfoid öncül hücreler (CLPs) olmak üzere iki temel oligopotent öncül hücre serisini oluşturmaktadır. Meydana gelen bu oligopotent öncül hücreler ise farklılaşma süreçlerine devam ederek kan dokusunda yer alan her bir hücreye nihai olarak farklılaşacak daha özelleşmiş hücreleri (lineage-committed effector cells) meydana getirirler. Mieloid hücre serisinden köken alan megakaryosit/eritrosit öncüllerinden (MEPs) eritrositler ve megakaryositler (platelet öncül hücresi); granülosit/makrofaj öncüllerinden (GMPs) makrofajlar ve granülositler meydana gelirken; T lenfositleri, B lenfositleri, dentritik hücre ve doğal katil hücreleri (Natural Killer, NK) ise lenfoid öncül hücre serisinden (CLPs) köken almaktadır [Seita and Weissman, 2010]. Hematopoezin hiyerarşik yapısı Şekil 1.1’de ayrıntılı olarak gösterilmiştir [Ratcliff et al., 2014].



Şekil 2.1: Hematopoezin hiyerarşik yapısının şematik gösterimi.

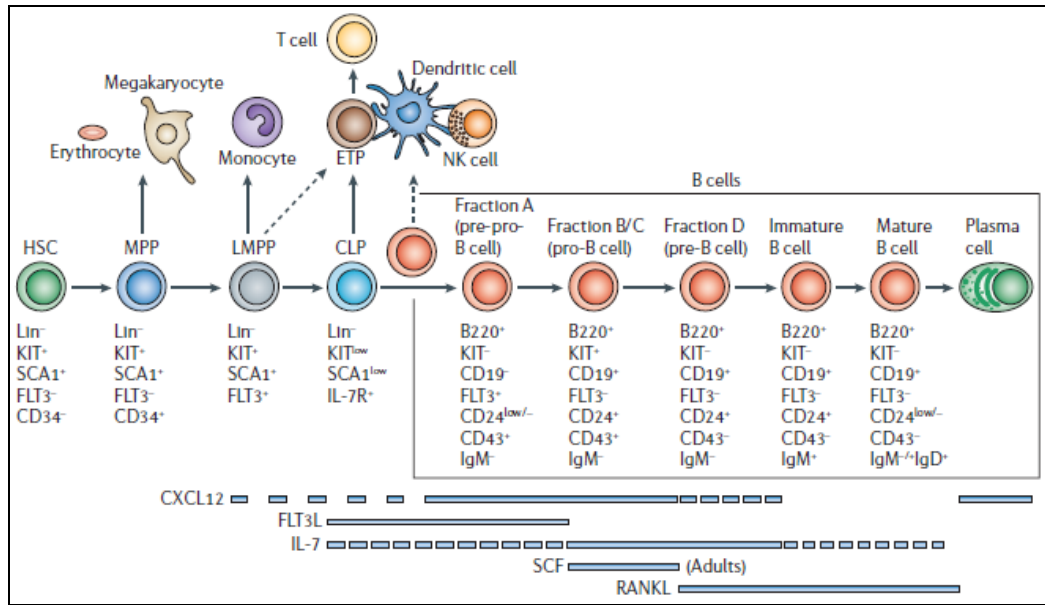
3. B LENFOSİTLERİ

Hematopoetik sistemin önemli hücreleri arasında yer alan B lenfositleri, klonal olarak farklı antijenik epitoplara özgün yüzey immunoglobulinleri (Ig) ifade eden bağışıklık sistemi hücreleridir [LeBien and Tedder, 2008]. B lenfositleri ve bu hücrelerden salgılanan antikorlar humoral ve adaptif bağışıklığın önemli elemanları arasında yer almaktadır; dolayısıyla bu hücrelerin işlevleri, gelişimi, seçilmesi ve aktivasyonu sırasında meydana gelen hasarların immün ve otoimmün hastalıklar ile kanser gibi farklı hastalıklara neden olduğu görülmüştür [Pieper et al., 2013]. Bu nedenle gerek doğrudan B lenfositlerinde meydana gelen hastalıklar gerekse dolaylı olarak bağışıklık sisteminden etkilenen hastalıkların teşhis ve tedavisi için B hücre farklılaşmasıyla ilgili süreçlerin anlaşılması önem arz etmektedir.

3.1. Kemik İliğinde Erken B Lenfosit Gelişimi

HKH'lerden köken alan B lenfositlerinin gelişim süreci birden fazla farklılaşma basamağı şeklinde ilerler ve farklı safhalardaki özelleşmiş B hücre tipleri, yüzey belirteçleri, hücre morfolojisi, gen ifadesi vb. gibi fenotipik ve işlevsel özellikleri sayesinde ayırt edilirler [Carsetti, 2000], [LeBien and Tedder, 2008]. B lenfositlerinin gelişim süreci fetal karaciğer (fetal dönem) ve kemik iliği (erişkinlerde) gibi primer lenfoid organlarda başlar [Chotinantakul and Leeaansaksiri, 2012]. Bu organlarda yerleşmiş olan HKH'lerden köken alan CLP hücreleri bölünerek B220, CD43 gibi yüzey proteinlerini ifade eden atasal B hücrelerini meydana getirirler. Bu öncül hücreler de taşıdıkları yüzey proteinlerinin ekspresyon profillerine göre farklı hücre fraksiyonları (A, B, C ve D) şeklinde, hiyerarşik olarak sınıflandırılırlar [Nagasawa, 2006]. Fraksiyon-A hücreleri tespit edilebilen ilk B hücre öncülleridir ve *in vitro*'da diğer fraksiyonlara farklılaşabilme kapasitelerinden dolayı pre-pro-B hücreleri olarak adlandırılırlar [Allman et al., 1999]. B hücre gelişimi sırasında görülen immünoglobulin gen düzenlenmesi, pre-pro-B hücre popülasyonunda başlar ve bu süreç pro-B olarak da adlandırılan mitotik olarak daha aktif ve büyük B/C hücre fraksiyonlarında ve pre-B olarak tanımlanan nispeten daha küçük ve dinlenme evresindeki fraksiyon-D hücrelerinde kombinasyonel olarak devam eder [Nagasawa, 2006]. İmmünoglobulin genlerindeki

düzenlenmenin tamamlanmasıyla yüzeylelerinde olgun IgM taşıyan ve pro-B hücrelerinden farklılaşan olgunlaşmamış (immature) B hücreleri primer lenfoid organlardan periferik kan dolaşımına geçerler. Kan dolaşımında antijenle karşılaşılması durumunda, olgunlaşmamış B lenfositleri lenf düğümü gibi sekonder lenfoid dokularda bir takım genetik değişimler sonucu gelişimini tamamlayarak olgun B lenfositleri ve son olarak antikor salgılayan plazma hücrelerine farklılaşırlar [Oracki et al., 2010]. HKH'den plazma hücresi farklılaşması sürecinde B lenfositlerinin geçtiği hücresel aşamalar Şekil 3.1'de şematize edilmiştir [Nagasawa, 2006].



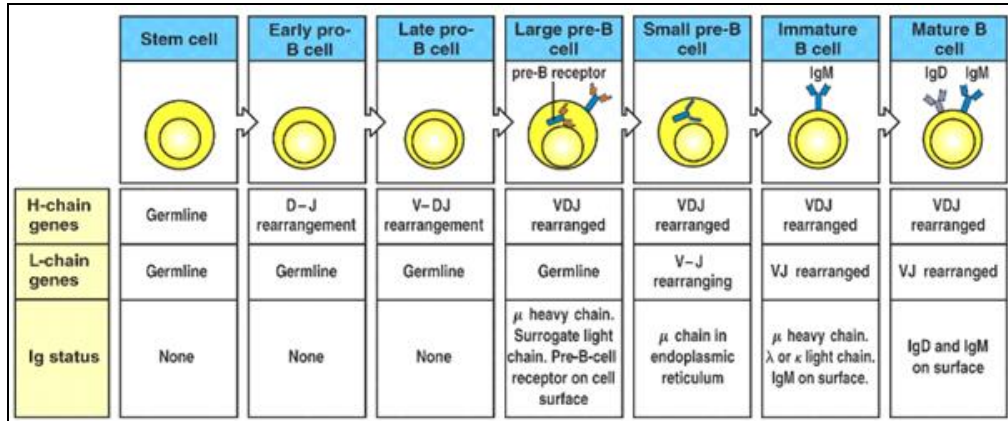
Şekil 3.1: B hücre gelişim safhalarının şematik gösterimi.

3.1.1. İmmünoglobulin Gen Düzenlenmesi

B lenfosit gelişimi sırasında hücre yüzeyinde ifade edilen immünoglobulinler (Ig), B hücre reseptörü (BCR) olarak görev yaparak bakteri, parazit, polipeptid gibi oldukça farklı antijenik yapıların tanınmasında rol oynarlar. Doğada bulunan farklı antijenlere özgün BCR (antikor) çeşitliliği ise Ig kodlayan gen kümelerinde meydana gelen yeniden düzenlenmeler (rearrangement) ile sağlanmaktadır [Zhang et al., 2004]. İnsanlarda BCR, temelde ağır (H) ve hafif (L) olmak üzere iki farklı polipeptid zincirinden ve her bir zincirde bulunan sabit (constant, C) ve değişken (variable, V) bölgelerden meydana gelmiştir [Treanor, 2012], [Wang and Clarke,

2007]. Bu zincirlerin ve bölgelerin sentezi ve çeşitliliği, üç farklı lokusta yerleşmiş olan değişken (variable, V), çeşitlilik (diversity, D) ve birleşme (joining, J) gen segmentlerinin somatik rekombinasyon mekanizması ile farklı kombinasyonlarda bir araya getirilmeleri ile sağlanır [Vettermann and Schlissel, 2010].

Genetik düzenleme ilk olarak pre-pro-B hücrelerinde Ig $D_H \rightarrow J_H$ gen segmentlerindeki rekombinasyon ile başlar ve pro-B hücrelerinde V segmentinin yeni düzenlenmiş olan $D_H J_H$ füzyon segmentine katılmasıyla ($V_H \rightarrow D_H J_H$) Ig ağır zincirini kodlayan genlerdeki kombinasyonel düzenlenme tamamlanmış olur. Ağır zincir sentezi tamamlanan ve öncül B hücre reseptörü (pre-BCR) olarak adlandırılan Ig molekülünün pre-B hücre yüzeyinde sunulmasıyla fonksiyonel bir sinyal iletim mekanizması işlemeye başlar [Jung et al., 2006]. Hücre yüzeyine gelen sinyallerin algılanması sayesinde erken safhadaki bu hücreler mitotik olarak aktif hale gelerek proliferatif kapasiteleri artar. Pre-B hücre safhasının geç dönemlerinde proliferasyonun durmasıyla rekombinasyon mekanizması tekrar aktif hale gelerek Ig hafif zincirini kodlayan segmentlerdeki genetik düzenlenme ($V_L J_L$) tamamlanır [Zhang et al., 2004]. Hafif zincirin pre-BCR yapısına katılmasıyla oluşan olgun IgM molekülünün olgunlaşmamış B hücre yüzeyinde ifade edilmesiyle, Şekil 3.2’de gösterilen gelişim süreci tamamlanmış olur [Murphy et al., 2008].



Şekil 3.2: B hücre gelişimine paralel olarak immünoglobülin genlerinde meydana gelen genetik düzenlemeler.

3.1.2. Oto-Reaktif B Lenfositlerinin Elenmesi

B lenfositlerinin gelişimi sırasında immünoglobulin kodlayan gen segmentlerinin farklı kombinasyonlarla bir araya gelmesiyle farklı antijenleri

tanıyabilecek antikor repertuarı oluşturulmuş olur. Fakat bu süreçte organizmanın kendi hücreleri veya makromoleküllerine antijenik afinitesi (self/oto-reaktif) olan antikorlar da üretilmektedir [Chan et al., 2012], [Goodnow et al., 2005]. Bu şekilde antikor taşıyan self reaktif B hücrelerinin organizmada neden olabileceği zararlar ve otoimmün hastalıkların engellenmesi amacıyla olgunlaşmamış B lenfositlerinin, kemik iliğinden kan dolaşımına geçmeden önce oto-reaktiviteleri kontrol edilir [Pillai et al., 2011]. Vücudun kendi antijenlerine özgün BCR taşıyan B lenfositleri, oto-reaktif antikor üretilmesinin engellenmesi amacıyla üç farklı süreçte tabi tutularak olası zararlar engellenmiş olur [Cambier et al., 2007], [Luning Prak et al., 2011]:

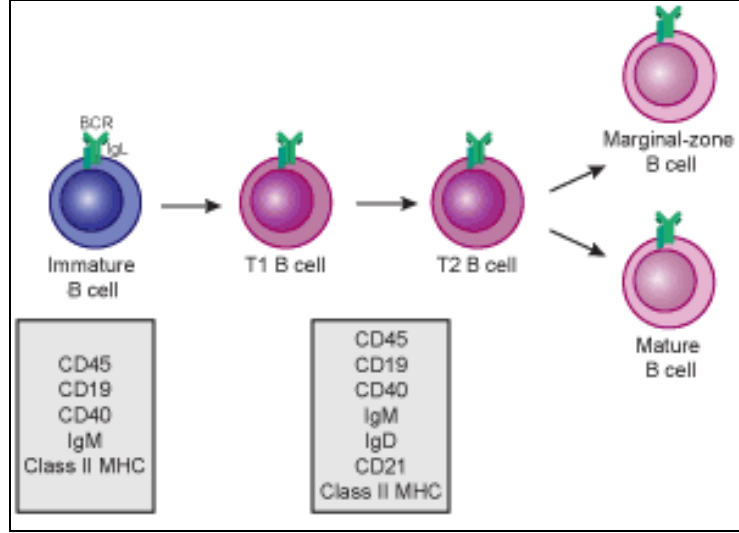
Reseptör düzenlenmesi (editing): Ig gen segmentleri arasında meydana gelen ikinci bir somatik rekombinasyon ile oto-reaktif BCR ortadan kaldırılmaktadır.

Anerji: Vücudun kendi antijenlerine düşük afinite gösteren B hücreleri antijene duyarsız hale getirilerek aktivasyonu engellenmektedir.

Klonal Delesyon: Güçlü oto-reaktif B hücreleri, oto-antikorlar üretilmemesi amacıyla apoptoz ile ortadan kaldırılmaktadır.

3.1.3. B Lenfositlerinin Aktivasyonu

Farklılaşma sürecini takiben kemik iliğinden kan dolaşımına geçerek ikincil lenfoid dokulara (dalak, lenf düğümleri, mukozal dokular vb.) göç eden [Chung et al., 2003] ve yüzeyinde olgun IgM taşıyan (self-reaktif olmayan) B lenfositleri, morfolojilerine ve immüfenotiplerine göre üç geçici (transitional) hücresel aşamada sınıflandırılırlar [Palanichamy et al., 2009]. T1 B hücresi olarak tanımlanan göç ederek dalağa yerleşen hücreler sonrasında T2 B hücre evresine geçerler. T2 B hücreleri ise naif B hücrelerinden önce bir geçiş formu olan T3 B hücrelerine [Bemark, 2015] ve sonrasında yüzeylerindeki BCR ve diğer reseptörler aracılığıyla alınan farklı sinyallere bağlı olarak foliküler (FO) veya marjinal zon (MZ) B hücrelerine farklılaşırlar [Pillai and Cariappa, 2009]. Henüz antijen ile karşılaşmamış bu hücreler naif (naive) veya olgun (mature) B hücresi olarak tanımlanır [Allman and Pillai, 2008]. Olgunlaşmamış B hücresi ile naif B hücre evreleri arasındaki geçici B hücre popülasyonları Şekil 3.3'te gösterilmiştir [Web 1, 2018].

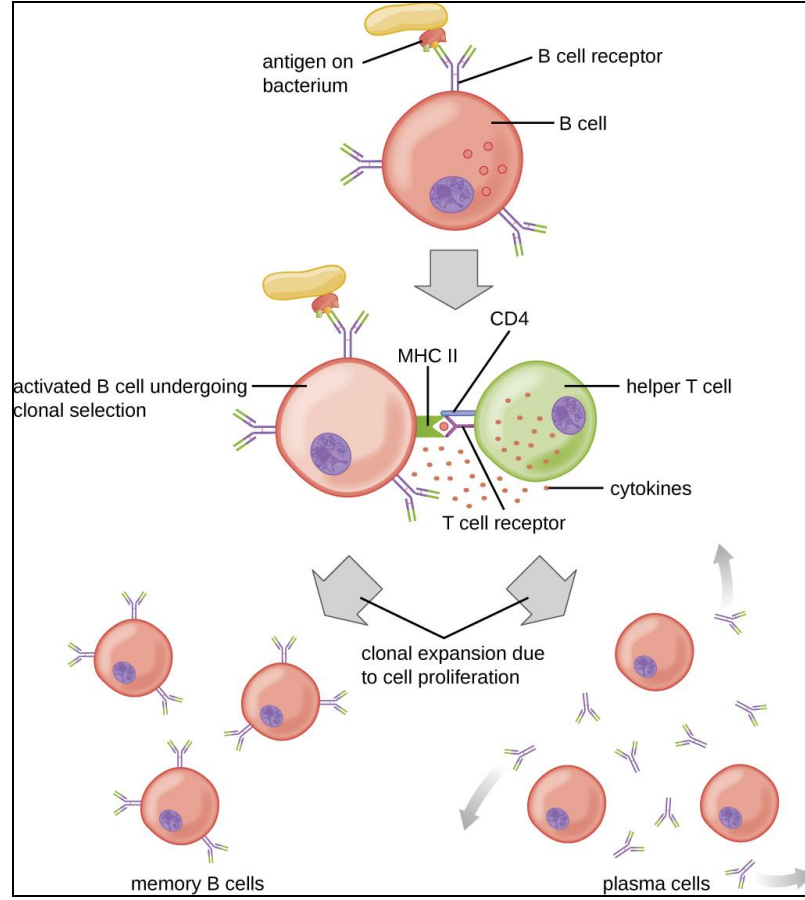


Şekil 3.3: Geçici B hücrelerinin MZ ve FO B hücrelerine farklılaşması.

Naif B lenfositlerinin ikincil lenfoid dokularda antijen ile karşılaşması, bu hücrelerin aktive olarak plazma hücresine farklılaşma sürecini tetiklemiş olur [Harwood and Batista, 2010]. B hücre aktivasyonu ve humoral yanıtın başlatılması T hücre-bağımlı (TD) ve T-hücre bağımsız (TI) olmak üzere iki farklı mekanizma ile gerçekleşir [Betts et al., 2013] ve bu süreçler immün yanıt oluşturan naif B hücre popülasyonu ve süresi, üretilen antikorun izotipi ve antijen afinitesi ile bağışıklık hafızasının uzunluğu gibi temel farklar ile sonuçlanır [Naradikian et al., 2014].

Bazı antijenler yalnızca organizmada T lenfositlerinin varlığına bağlı olarak (T cell-dependent), birkaç gün içerisinde immün yanıt oluşmasını tetikleyebilir [Murphy et al., 2008]. TD antijen olarak adlandırılan bu moleküller hücre yüzeyinde bulunan BCR tarafından tanınmasının ardından reseptör-aracılı endositoz ile hücre içersine alınarak yıkıma uğratılır. Degredasyonu takiben oluşan peptid parçaları olgun B hücre membranında bulunan MHCII (Major Histocompatibility Complex II) molekülleri vasıtasıyla yardımcı T lenfositlerine (T_H) sunulurlar [Blum et al., 2013]. MHC II-antijen kompleksinin T_H hücre yüzeyinde bulunan T hücre reseptörü (TCR) tarafından tanınması, bir yüzey proteini olan CD40L'nin ekspresyonunun yanı sıra interleokin-4 (IL-4) ve interleokin-21 (IL-21) gibi sitokinlerin T_H hücrelerinden salgılanmasını uyarır. Yardımcı uyarıcı (co-stimulatory) faktör olan CD40L'nin B hücre yüzey reseptörü olan CD40'a; salgılanan sitokinlerin de özgün reseptörlerine bağlanması, hücre proliferasyonu, Ig izotip değişimi (class switching) ve somatik hipermutasyonu (SHM) tetikleyerek B lenfositlerinin aktivasyonu ve uzun ömürlü (long-lived) plazma hücrelerine veya hafıza (memory) B hücrelerine farklılaşması ile

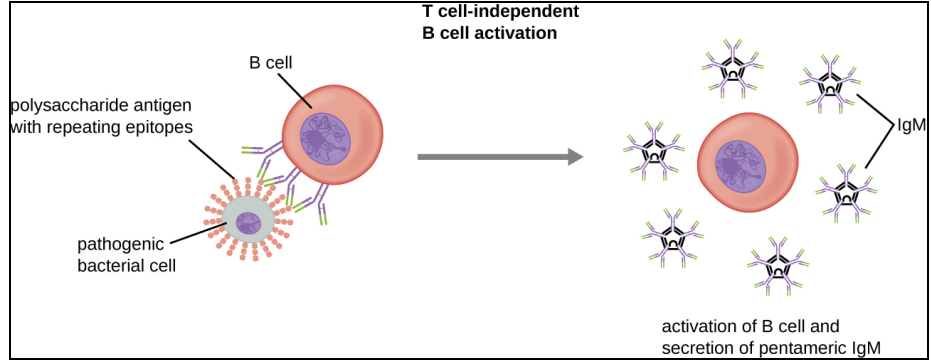
sonuçlanır [Crotty, 2015], [McHeyzer-Williams and Ahmed, 1999]. TD-B hücre aktivasyon aşamaları Şekil 3.4'te gösterilmiştir [Parker et al., 2016].



Şekil 3.4: B lenfositlerinin TH hücreleri aracılığıyla aktivasyonu.

Organizma dışı polisakkaritler, metillenmemiş CpG DNA gibi T hücre-bağımsız (TI) antijenler ise T lenfosit varlığına ihtiyaç duymadan doğrudan B lenfositlerini aktive edebilirler [Nutt et al., 2015]. Meydana gelen humoral yanıt, TD aktivasyonun aksine oldukça hızlı gelişir ve üretilen antikorların antijen afinitesi daha düşük olmasının yanı sıra, daha kısa sürelidir [Naradikian et al., 2014]. Patojen-bağımlı moleküler bileşenlerin (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) doğrudan B hücre yüzeyinde bulunan Toll-like reseptörler (TLR) [Pone et al., 2012] veya BCR'ler tarafından tanınması B lenfosit aktivasyonunu başlatır [Mogensen, 2009], [Pone et al., 2012]. TI aktivasyonu sekonder lenfoid dokularda gerçekleşmesine rağmen süreç lenfoid folikülü dışında (extrafollicular) tamamlanır. Hücre proliferasyonu, Ig izotip değişimi ve SHM'nun ardından naif B hücreleri, genellikle kısa ömürlü (short-lived) plasmablastlara farklılaşırlar [MacLennan et al.,

2003], [Pone et al., 2012]. Şekil 3.5'te TI B hücre aktivasyonu görsel olarak özetlenmiştir [Parker et al., 2016].



Şekil 3.5: B lenfositlerinin T hücrelerinden bağımsız aktivasyonu.

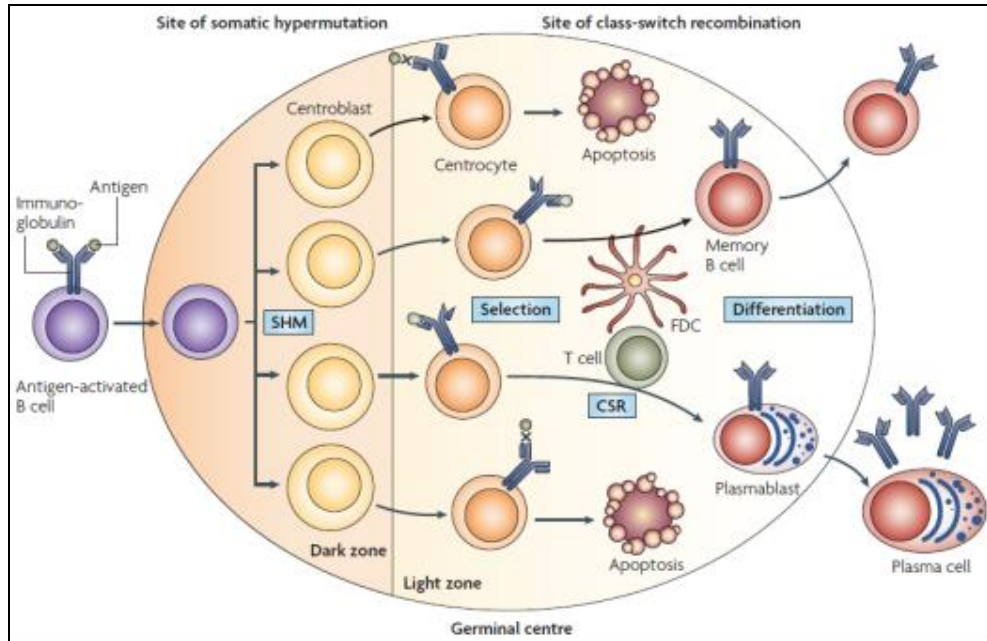
4. PLAZMA HÜCRESİ

Kemik iliğinden köken alarak sekonder lenfoid dokularda devam eden B hücre gelişim süreci, immünolojik açıdan fonksiyonel olan plazma hücrelerinin terminal farklılaşması ile sona erer. Sonuç olarak, üretilen olgun plazma hücreleri, farklılaşma süreci sırasında karşılaşılan antijene özgün antikor üreten ve salgılayan bir beyaz kan hücresi olarak immün sistemdeki yerini almış olur [Nutt et al., 2015].

4.1. Plazma Hücresinin Gelişimi

Karşılaşılan yabancı antijenle aktivasyonun (TD) ardından bazı özel kemokin reseptörlerinin artan ifadesinden dolayı naif B hücreleri sekonder lenfoid organların foliküler yapıları içerisindeki T hücrelerce zengin (T-hücre zonu) bölgelere göç ederler [Allen et al., 2007]. Bu bölgede T lenfositleri ve dentrit hücresi gibi antijen sunan hücreler (APC) ile bağlantı kuran B lenfositleri, yüzey reseptörlerinin karşılıklı olarak etkileşmesi ve salgılanan sitokinlerin indüklemesi sonucu fizyolojik olarak tamamen aktive olurlar [Klein and Dalla-Favera, 2008]. Gelişimin bu aşamasında, IgM⁺/IgD⁺ B hücrelerinin birkaç gün süren yoğun proliferasyonu sonucunda folikül içerisinde germinal merkez (germinal center, GC) adı verilen histolojik yapılar ayırt edilmeye başlar [Zhang et al., 2016]. Germinal merkez dokusal ve hücre bazda incelendiğinde, sentroblast adı verilen proliferatif kapasitesi yüksek B lenfositlerinin klonal çoğalmasıyla oluşan karanlık (dark) zon ile T hücreleri, foliküler dentrit hücresi (FDC) ve makrofajlarla etkileşim halinde bulunan sentrosit olarak adlandırılan daha küçük ve proliferatif aktivitesi durmuş B lenfositlerinin oluşturduğu aydınlık (light) zon adı verilen iki bölgeden oluştuğu görülmüştür [Oracki et al., 2010]. Karanlık bölgedeki sentroblastların yoğun bir şekilde bölünmesi ve klonal çoğalmasıyla antikor salgılayacak hücre sayısının ve somatik hipermutasyon (SHM) ile antikor çeşitliliği ve antijen afinitesinin artırılması sağlanır [Li et al., 2004]. SHM, ilgili gen segmentlerinde bulunan sıcak mutasyon noktalarında tek nükleotid değişimi, kısa delesyonlar veya duplikasyonlar şeklinde gerçekleşerek immünoglobülin değişken bölgesinin (IgV) yeniden düzenlenmesine imkan sağlar [Papavasiliou and Schatz, 2002]. Sentrositlere farklılaşan hücreler germinal merkezin aydınlık bölgesine doğru ilerler [Klein and Dalla-Favera, 2008].

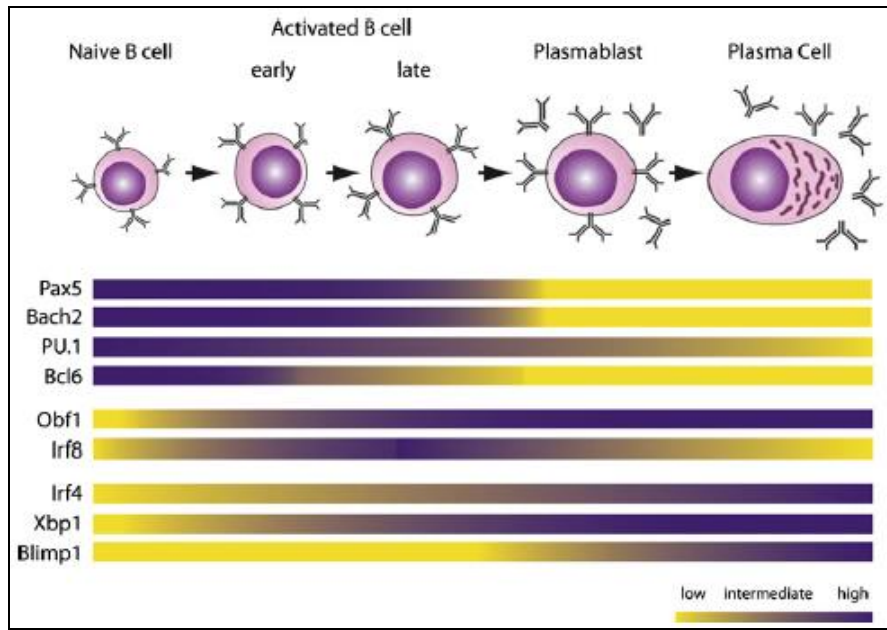
Köken aldıkları sentroblastlara ve post-GC hücrelere (hafıza B hücreleri ve plazma hücreleri) farklılaşma kapasitelerinden dolayı aydınlık bölgeye yerleşen sentrositler oldukça heterojen bir popülasyon oluştururlar [Klein and Dalla-Favera, 2008]. Aydınlık bölgede gerçekleşen gelişim basamağının ilki SHM mekanizması ile yeni sentezlenen antikorlardan yüksek afiniteli olanların seçilmesi ve oto-reaktif olanların elenmesidir [Mesin et al., 2016]. Afinitesi düşük veya self-reaktif antikor taşıyan sentrositler apoptoz ile ortadan kaldırılırken, afinitesi test edilmiş diğer sentrositlerde izotip değişim rekombinasyonu (class switch recombination, CSR) gerçekleşir [Stavnezer and Schrader, 2014]. Sentrositlerin, yardımcı immün hücrelerle etkileşimi sonucu Ig ağır zincirini kodlayan genlerde gerçekleşen CSR, serbest uçların homolog olmayan şekilde birleştirilmesiyle (non-homologous end joining, NHEJ) antikor izotipini (sınıfı) belirleyen sabit bölgenin değiştirilmesini sağlar [Stavnezer et al., 2008]. Bu sayede, başlangıçta naif B lenfositlerinde taşınan IgM/IgD izotipinin, etki mekanizması birbirinden farklı olan IgA, IgE, IgG gibi diğer sınıflara dönüşümüne imkan sağlanmış olur [Hoffman et al., 2016], [Shapiro-Shelef and Calame, 2005]. Gelişimin son aşamasında izotip değişimi gerçekleşen hücreler, çevresel sinyallerin ve transkripsiyon faktörlerinin etkisiyle plazmablastlara ve sonrasında antikor salgılayan olgun plazma hücrelerine veya hafıza B hücrelerine terminal olarak farklılaşırlar [Fairfax et al., 2008]. Germinal merkezde gerçekleşen farklılaşma basamakları Şekil 4.1’de gösterilmiştir [Klein and Dalla-Favera, 2008].



Şekil 4.1: Plazma hücrelerinin germinal merkezdeki gelişim evreleri.

4.1.1. Plazma Hücre Gelişiminin Transkripsiyonel Kontrolü

Hematopoetik kök hücreden plazma hücresi farklılaşması süreci tümüyle karmaşık bir transkripsiyonel ağın kontrolü altındadır. Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te gösterildiği üzere birbirleri ile etkileşim içinde olan bu transkripsiyon faktörlerinin bazıları erken B hücre karakterinin ortaya çıkışında rol oynarken, bazıları ise gelişimin son aşamalarında aktive olarak plazma hücresinin terminal farklılaşma sürecinde etkin rol alır [Nutt et al., 2011].



Şekil 4.2: B lenfositleri ve plazma hücrelerindeki transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon seviyelerinin gösterilmesi.

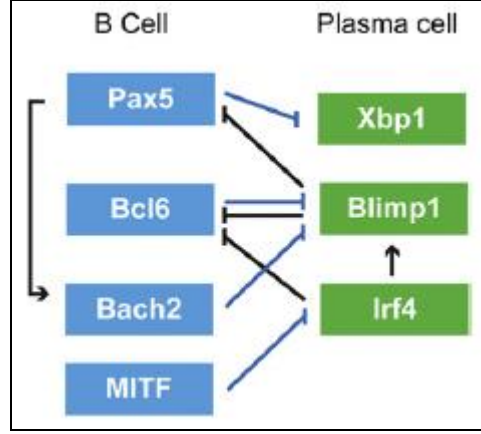
Transkripsiyonel aktivatör veya represör olarak görev yapan Paired Box Protein 5 (PAX5), B hücre gelişiminin anahtar düzenleyicisi olarak rol oynar [Nutt et al., 2011]. Hematopoez sırasında CLP hücrelerinin erken B hücre karakterine yönelmesini sağlayan PAX5, gelişim süresince B hücre karakterinin ortaya çıkışında, korunmasında ve plazma hücre farklılaşmasını engellemekle görevlidir [Cobaleda et al., 2007]. PAX5, B hücre gelişimi boyunca BCR ünitelerini kodlayan genlerin (Ig α), CD19, CD21 gibi immün reseptörlerin ve Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4), IRF8, BTB and CNC Homologue 2 (BACH2), Aiolos (IKZF3), SPIB gibi B hücre fonksiyonları için gerekli olan transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesinde rol alırken, olgun antikorun sentezlenmesi için gerekli IgH, IgL, IgJ segmentlerinin ekspresyonunu ve X-Box-binding Protein 1 (XBP1), FMS-related Tyrosine Kinase 3

(FLT3), CC-chemokine Receptor 2 (CCR2), CD28 gibi plazma hücre gelişiminde etkin olan proteinleri baskıladığı gösterilmiştir [Nutt et al., 2015], [Pridans et al., 2008]. Bu nedenle B hücre gelişim evrelerinde yüksek seviyede ifade edilen PAX5'in, plazma hücresi farklılaşması için baskılanması gerekmektedir [Nera and Lassila, 2006].

PAX5'in pozitif kontrolü altında olan BACH2, B hücrelerinde yüksek seviyede ifade edilirken, plazma hücre farklılaşması sırasında baskılanmaktadır. BACH2, *Aicda* gen ifadesini düzenleyerek GC oluşumu, SHM ve CSR mekanizmalarını kontrol etmesinin yanı sıra, önemli plazma hücresi transkripsiyon faktörlerinden olan BLIMP-1'i baskılayarak plazma hücre farklılaşmasını engellemektedir [Kallies and Nutt, 2010].

B hücre gelişiminde gerekli diğer bir transkripsiyon faktörü olan ve B hücre lenfomasında (BCL) onkogenik özelliklere sahip olan B-cell Lymphoma 6 (BCL-6), transkripsiyonel bir represör olarak görev yapar [Basso and Dalla-Favera, 2010]. Özellikle GC B hücrelerinde ifadesi oldukça yüksek olan BCL-6, *Myc*, *Bcl-2* gibi onkogenlerin ifadesini düzenleyerek bu hücrelerin proliferasyonunu artırmakla beraber BLIMP-1'i baskılayarak plazma hücre farklılaşmasından önce GC oluşumu ve işlevleri için zaman kazandırılmasını sağlamaktadır [Huang and Melnick, 2015]. Bununla birlikte BCL-6, GC B hücrelerinde p21, p53 gibi hücre döngüsünü düzenleyen proteinlerin ifadesini kontrol ederek DNA hasar yanıtını baskılar ve somatik hipermutasyonun gerçekleşmesine imkan sağlar [Basso and Dalla-Favera, 2012].

Microphthalmia-associated Transcription Factor (MITF), IRF4'ü baskılaması sonucu plazma hücre farklılaşmasını inhibe ederek olgun B hücre karakterinin korunmasını sağlayan transkripsiyon faktörüdür [Lin et al., 2004]. Buna ek olarak, Octamer-binding Factor 2 (OCT2), IRF8, MTA3, PU.1, SPIB gibi transkripsiyon faktörleri de GC ve MZ oluşumu, CSR, SHM gibi önemli süreçlerde yer alarak B hücre gelişiminde rol oynamaktadır [Nutt et al., 2015].



Şekil 4.3: Farklı hücre karakterlerinin ortaya çıkmasında rol oynayan transkripsiyon faktörlerinin birbirleri üzerindeki düzenleyici etkileri.

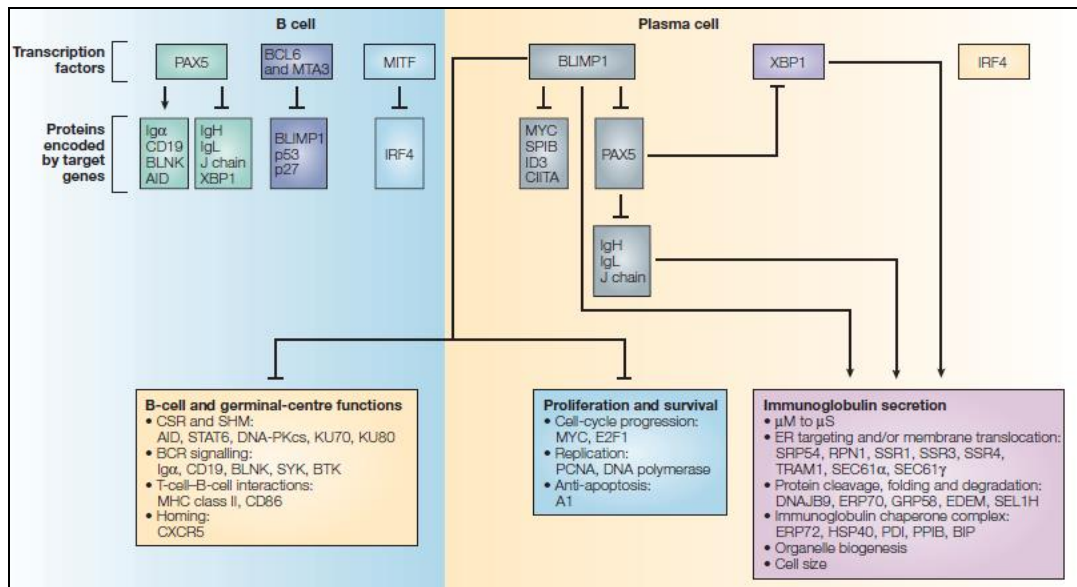
B hücrelerinin plazma hücrelerine terminal farklılaşması ve antikor salgılanması için gerekli transkripsiyon faktörü olan B-Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1 (BLIMP1)'in ekspresyonu ilk olarak plazmablast hücrelerinde görülmeye başlar, antikor salgılayan uzun ömürlü plazma hücrelerinde en üst seviyeye ulaşır [Recaldin and Fear, 2016]. Yapılan genetik analizler BLIMP1'in üç farklı gen ekspresyon programını düzenleyerek plazma hücre gelişiminde rol oynadığını ortaya koymuştur [Martins and Calame, 2008]:

- BLIMP1, MYC ve E2F1 gibi transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu doğrudan veya dolaylı olarak azaltarak hücre bölünmesi ve hücre döngüsüne girişi baskılar [Martins and Calame, 2008], [Shaffer et al., 2002].
- BLIMP1, olgun plazma hücrelerinde B hücre karakterinin oluşmasında rol oynayan PAX5, BCL-6, SPIB gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini negatif olarak düzenleyerek B hücre gelişimi ve proliferasyonunun durmasının ardından hücrelerin terminal farklılaşmaya yönelmesini ve plazma hücre karakterinin devamlılığını sağlar [Shaffer et al., 2002], [Shapiro-Shelef and Calame, 2005].
- BLIMP1, endoplazmik retikulum stres cevabında görev alan XBP1, ATF4 ve ATF6 gibi aracılarn aktivitesini düzenleyerek Ig sentezi ve salgılanmasında rol oynar [Tellier et al., 2016].

Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4), gelişim sürecinde hem B hücre hem de plazma hücre evrelerinde rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür ve aktivitesi konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir [Ochiai et al., 2013]. IRF4,

konsantrasyonunun düşük olduğu B hücrelerinde PU.1 ile birlikte *Pax5* geninin düzenleyici bölgesine bağlanarak bu genin ekspresyonunu kontrol eder ve *Aicda*, *Bcl-6* gibi genleri aktive ederek GC oluşumunu ve CSR'ı artırır; plazma hücrelerinde konsantrasyonunun artmasıyla birlikte *Bcl-6* geninin ifadesini baskılayarak BLIMP1'in aktivasyonunu sağlamaktadır [Alinikula et al., 2011], [De Silva et al., 2012].

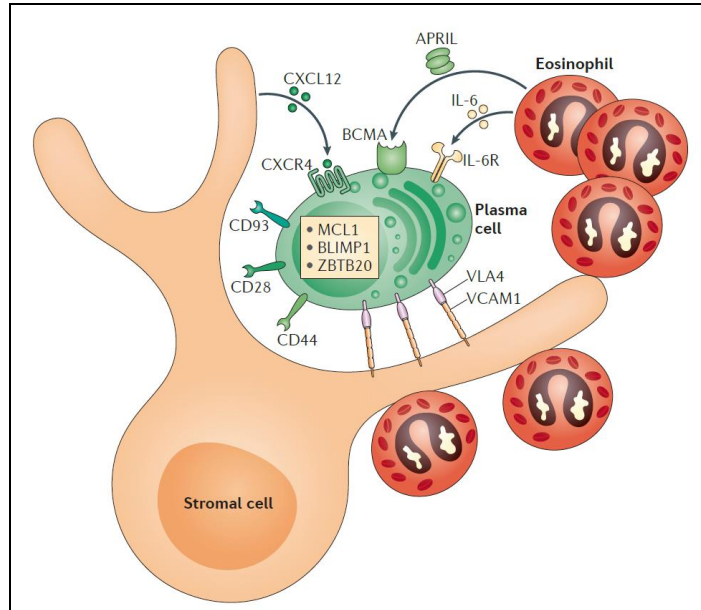
X-Box-binding Protein 1 (XBP1), plazma hücrelerinde fonksiyonel transkripsiyon faktörlerindendir ve aşırı protein sentezine bağlı olarak katlanmamış protein yükünden kaynaklanan endoplazmik retikulum (ER) stresinin tetiklediği “katlanmamış protein cevabı” (Unfolded Protein Response, UPR) yolaklarında aracı molekül olarak görev yapar [Janssens et al., 2014]. XBP1 ifadesi, B hücre gelişimi süresince PAX5 tarafından baskılanır. Terminal farklılaşmayla birlikte PAX5'in negatif regülasyonuna bağlı olarak XBP1'in plazma hücrelerindeki aktivitesi artar [Delogu et al., 2006]. Yapılan çalışmalar XBP1'in plazma hücre farklılaşmasında doğrudan fonksiyonel olmasa da, artan Ig sentezine bağlı olarak meydana gelen UPR yolağında görev alarak antikor sentezi ve salgılanması için gerekli olduğunu ortaya koymuştur [Todd et al., 2008]. B hücre ve plazma hücre gelişiminde rol oynayan faktörler ve işlevleri bir bütün olarak Şekil 4.4'te özetlenmiştir [Shapiro-Shelef and Calame, 2005].



Şekil 4.4: B hücre ve plazma hücre gelişiminde rol oynayan faktörler ve işlevleri.

4.2. Plazma Hücre Gelişiminde ve Sağ Kalımında Rol Oynayan Faktörler

Plazma hücre gelişimi, erişkin kemik iliği gibi primer lenfoid dokularda başlar ve lenf düğümleri ve dalak gibi sekonder lenfoid dokularda devam eder. Sekonder lenfoid dokularda farklılaşması tamamlanan plazma hücreleri, kan dolaşımı aracılığıyla tekrar kemik iliğine (BM) göç ederek burada yaşamaya ve antikor salgılamaya devam ederler [Nagasawa, 2006]. Kemik iliği mikroçevresi olarak da tanımlanan ve “niş (niche)” adı verilen özel hücresel bölgelere yerleşen antikor salgılayan plazma hücreleri, kemik iliği dokusunun sayıca %0,1 ila %1’ini oluşturur ve çevrelerinde bulunan kemik iliği destek hücreleri (stroma hücreleri) tarafından salgılanan yaşam (survival) sinyalleri sayesinde aylarca canlılıklarını devam ettirebilirler [Oracki et al., 2010], [Terstappen et al., 1990]. Gerek plazma hücresinin kemik iliğindeki gelişim süreci gerekse uzun ömürlü plazma hücrelerinin kemik iliğindeki sürekliliği, nişleri oluşturan stroma hücreleri, kemik iliği endotel hücreleri, osteoblastlar ve farklı tipte kan hücreleri ile plazma hücrelerinin doğrudan etkileşimi ve salgılanan faktörlerin doğrudan veya dolaylı otokrin/parakrin etkileri ile sağlanmaktadır [Nagasawa, 2006], [Tellier and Kallies, 2014]. Plazma hücre gelişimi ve sağ kalımında etkili olan çevresel faktörler Şekil 4.5’te şematize edilerek, başlıklar halinde özetlenmiştir [Nutt et al., 2015].



Şekil 4.5: Plazma hücre gelişimi ve sağ kalımında rol oynayan çevresel faktörler.

4.2.1. Sitokinler

Sitokinler, sinyal iletiminde rol oynayarak hücre-hücre etkileşimi ve iletişimini (otokrin, parakrin, endokrin) sağlayan ve salgılandıkları hücre tipine göre monokinler (monositlerden salgılanan), lenfokinler (lenfositlerden salgılanan) ve interlökinler (lökositlerden salgılanan) olarak sınıflandırılan küçük (5-20 kDa) proteinlerdir [Zhang and An, 2007]. A proliferation-inducing ligand (APRIL), B-cell activating factor (BAFF), interlökin-21 (IL-21), interlökin-7 (IL-7), interlökin-4 (IL-4), interlökin-6 (IL-6) ve interlökin-10 (IL-10) B hücre gelişiminde önemli rol oynayan sitokinlerden bazılarıdır [Chu and Berek, 2013], [Vazquez et al., 2015].

APRIL ve BAFF, TNF süper ailesinin bir üyesidir ve BAFF-R (BAFF reseptörü), TACI (Transmembrane activator and calcium-modulating and cyclophilin ligand interactor), BCMA (B cell maturation antigen) gibi yüzey reseptörleri ile etkileşerek, kemik iliğinde B hücre gelişiminde, aktivasyonunda, farklılaşmasında ve sağ kalımında rol oynar [Chu and Berek, 2013]. BAFF, her üç reseptöre bağlanabilir ve genellikle plazmablast farklılaşmasında etkiliyken, APRIL plazma hücrelerinde ifade edilen TACI ve BCMA reseptörleri tarafından tanınır ve plazma hücrelerinin kemik iliğinde uzun süre yaşayabilmeleri için gereklidir [Bossen and Schneider, 2006].

B hücre farklılaşmasında görev alan IL-21, çoğunlukla FO ve GC T_H hücreleri tarafından yoğun bir şekilde ifade edilmektedir [Moens and Tangye, 2014]. IL-21 etkisini Janus kinaz (JAK/STAT) sinyal yolağında bulunan transkripsiyonel aktivatörleri aktive ederek gösterir [Habib et al., 2003]. B hücre gelişiminde IL-21'in rol oynadığı bazı fonksiyonlar maddeler halinde listelenmiştir [Moens and Tangye, 2014]:

- CD40L ile birlikte B hücre proliferasyonunu artırır.
- Olgunlaşmamış B hücrelerinde BCR ağır ve hafif zincirlerinin füzyonunu uyarır.
- BCL-6, Blimp-1, XBP-1, AICDA gibi önemli transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu artırır.
- IL-4 ile birlikte CSR'i uyararak, seçici olarak IgG₁, IgG₃, IgA₁ izotiplerinin oluşmasını ve hücrelerden IgE salgılanmasını sağlar.

- B hücresinden, IgM, IgG, IgA ve IgE salgılayan plazma hücrelerinin farklılaşmasını ve plazma hücrelerine özgü yüzey proteini olan CD138 (Syndecan-1) ifadesini artırır.
- İkincil lenfoid dokularda farklılaşması henüz tamamlanmış plazma hücrelerinin sağ kalımını uyarır.

IL-7, Pax5, E2A, EBF gibi transkripsiyon faktörleri ile birlikte çalışarak lenfoid seri hücrelerinin B hücre öncüllerine farklılaşmasında ve preB-proB hücre geçişinde görev alarak pro-B hücre serisinin oluşmasında fonksiyoneldir. Farklılaşan B lenfositlerinin çoğalmasının yanı sıra pro-B hücrelerinin sağ kalımında (survival) farklı faktörlerle birlikte sinerjistik rol oynayan IL-7, aynı zamanda bu hücrelerde B hücre reseptörlerinin yeniden düzenlenmesi (rearrengement) için gerekli faktörlerdendir [Corfe and Paige, 2012].

Özellikle T_H hücrelerden salgılanan IL-4, B hücre proliferasyonunu tetikleyebilme kapasitesinden dolayı B hücre büyüme faktörü olarak tanımlanmıştır [Tadmori et al., 1989]. Dinlenme evresindeki B hücrelerinin hacminin artmasını sağlayan IL-4, CD40L ile birlikte aktive olmuş B hücrelerinin bölünmesi, sağ kalımı ve farklılaşmasını tetiklemektedir [Rush and Hodgkin, 2001]. Bununla birlikte IL-4'ün etkileri arasında, oluşturulan immün cevaba bağlı olarak IgG₁ ve IgE gibi bazı Ig izotiplerinin salgılanması ve B hücrelerinde MHC II ekspresyonunun uyarılması da yer almaktadır [Lombard-Platet et al., 1997].

IL-6 lenfositler, fibroblastlar ve periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) gibi birçok hücre tipinden salgılanmaktadır [Van Snick, 1990]. B hücrelerinin uyarılmasını takiben IgG, IgM gibi immünoglobülinlerin salgılanmasını artırabilmesinden dolayı B cell stimulation factor 2 (BSF-2) olarak da adlandırılan IL-6'nın kemik iliğinde plazma hücrelerinin sağ kalımını artırdığı gösterilmiştir [Vazquez et al., 2015].

İltihap engelleyici (anti-inflammatory) sitokinler arasında yer alan IL-10, B hücre gelişiminde oldukça önemli bir konuma sahiptir. Erken B hücre gelişiminde CD40L ile birlikte proliferasyonu artıran IL-10, olgunlaşmamış B lenfositlerinde ağır ve hafif zincirlerin bağlanarak BCR olgunlaşmasını sağlar ve farklılaşma süresince Blimp-1, AICDA gibi transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu indükler [Moens and Tangye, 2014]. IL-10, CSR mekanizması ile özellikle IgG₁, IgG₃, IgA gibi Ig

izotiplerinin ortaya çıkmasını sağlamasının yanı sıra, B hücrelerinin IgM, IgG veya IgA salgılayan plazma hücrelerine farklılaşmasını uyarır [Heine et al., 2014].

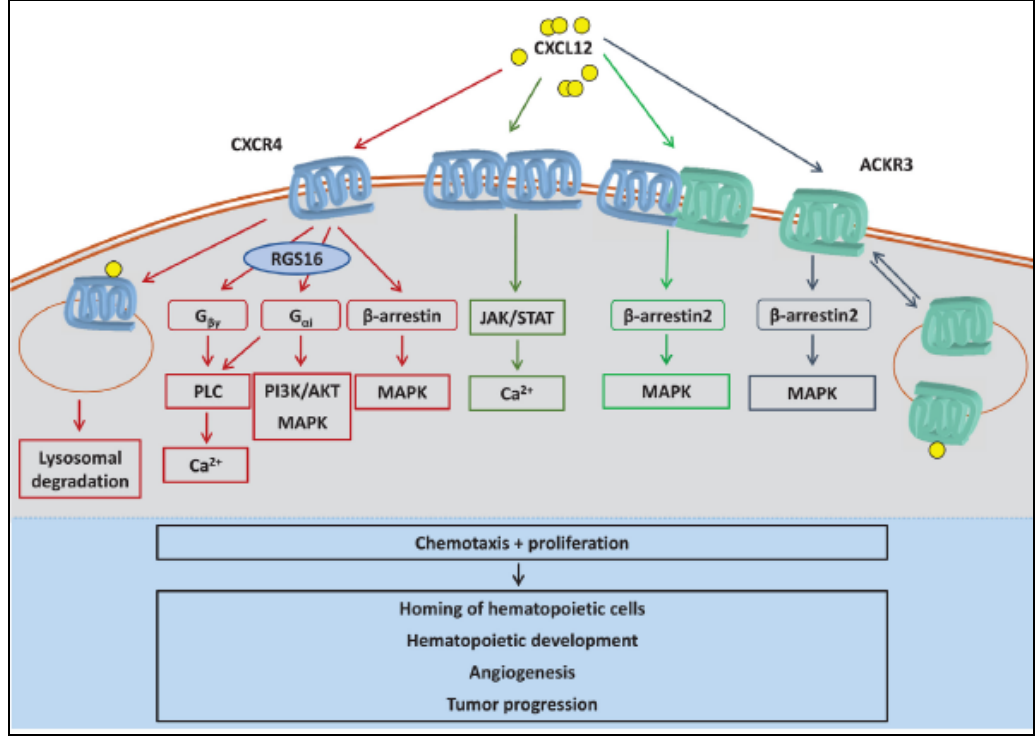
4.2.2. İnterferonlar

İnterferonlar (IFNs) virüs, bakteri, parazit gibi patojenlerin ve tümör hücrelerinin varlığına cevap olarak konak hücreden salgılanan sinyal proteinleridir [Stark et al., 1998]. Tip 1 IFN ailesi içinde yer alan IFN- α ve IFN- β , kemik iliğindeki hücreler tarafından sürekli ifade edilirler ve sağlıklı B hücre popülasyonlarının seleksiyonunda fonksiyoneldirler [Vazquez et al., 2015]. Olgun B hücrelerinin IFN- α/β ile uyarılması, BCR füzyonunu indükleyerek B hücrelerinin immün uyarılara karşı hassasiyetini ve cevabını artırır [Braun et al., 2002]. Özellikle IFN- α , B hücre aktivasyonunu uyararak hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını artırır [Demengeot et al., 1997].

Tip 2 IFN üyesi olan IFN- γ , T_H ve NK hücreler tarafından üretilir [Vazquez et al., 2015]. IFN- γ , IgM taşıyan öncül B hücre sayısındaki düşüşe bağlı olarak IgM üretimini inhibe ettiği için B hücre cevabının oluşmasında baskılayıcı rol oynar [Abed et al., 1994]. Bununla birlikte IFN- γ , doğrudan IgG alt tipleri ve IgE gibi immünoglobülin izotiplerinin üretimini kontrol ederek humoral yanıtın oluşmasında düzenleyici rol oynar [King and Nutman, 1993].

4.2.3. Kemokinler

Kimyasal yönlendirici sitokinler (kemotaktik ajan) olarak da bilinen kemokinler, plazma hücrelerinin gelişimleri süresince doğru lokasyonlara yönlendirmelerini ve yerleşmelerini sağlarlar [Griffith et al., 2014]. CXC-chemokine ligand 12'nin (CXCL12), özgün hücre yüzey reseptörüne (CXC-chemokine receptor 4, CXCR4) bağlanarak erken B hücre (pre-pro-B hücresi) gelişiminde ve farklılaşmasını tamamlayan plazmablastların sekonder lenfoid dokulardan kemik iliğine göç ederek nişlerdeki lokalizasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir [Karpova and Bonig, 2015]. CXCR4, G protein ile eşleşmiş (G-coupled) reseptör ailesindendir ve stromal cell-derived faktör 1 (SDF1) olarak da bilinen CXCL12'nin bağlanmasıyla yapısındaki heterotrimerik $G_{\alpha i}$ üniteleri aktive olarak Şekil 4.6'da görülen hücre içi sinyal yollarını aktive eder [Pawig et al., 2015].



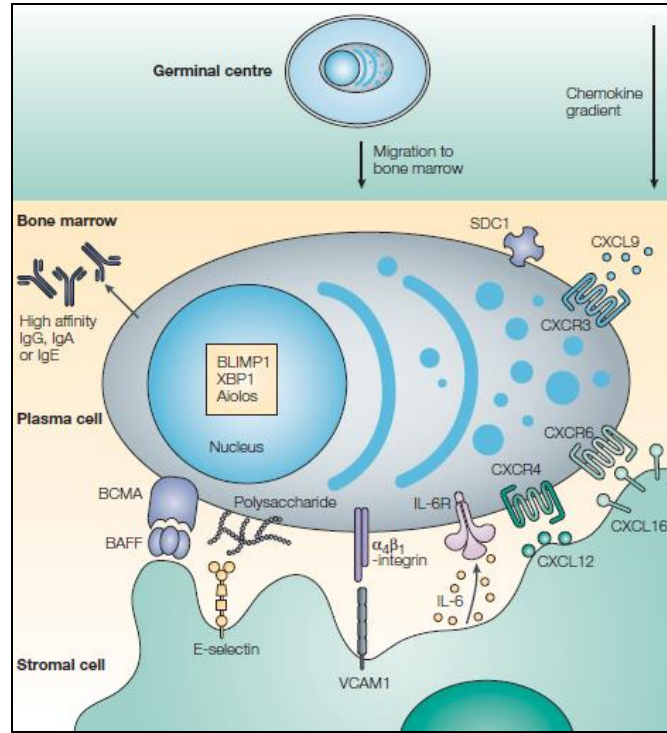
Şekil 4.6: CXCL12'nin, özgün yüzey reseptörü CXCR4'e bağlanması sonucu aktive olan hücre içi sinyal yolları.

Enflamasyonu artıran kemokinler (inflammatory chemokines) olan CXCL9, CXCL10 ve CXCL11 ise CXCL12'nin aksine, hücre yüzeyinde bulunan CXCR3 reseptörüne bağlanarak plazmablastların ikincil lenfoid dokulardan iltihabın geliştiği bölgeye göç etmesini uyarır [Nutt et al., 2015].

4.2.4. Hücre-Hücre Etkileşimleri

Plazma hücre gelişiminde ve sağ kalımında parakrin sinyallerin yanı sıra hücreler arasında doğrudan gelişen bağlantılar da oldukça önemlidir. Bu etkileşimler genellikle yüzey proteinleri, integrinler ve membran karbonhidratları gibi adezyonda görev alan moleküller aracılığıyla sağlanmaktadır [Shapiro-Shelef and Calame, 2005]. İntegrinler hücre-hücre ve hücre-matriks adezyonunda rol oynayan heterodimerik yüzey reseptör ailesidir [Barczyk et al., 2010]. Plazma hücre yüzeyinde ifade edilen iki büyük integrin grubundan biri olan Very Late Antigen 4 (VLA4, α₄β₁-integrin), kemik iliği stroma hücreleri, endotel hücreleri, antijen sunan hücreler gibi farklı tipteki hücre yüzeyinde ifade edilen özgün ligandı Intercellular Adhesion Molecule 1 (VCAM1) ile bağlanarak plazma hücre göçünü ve antijen tanıma gibi süreçleri uyarmaktadır [Arana et al., 2008]. Plazma hücre yüzeyinde

bulunan polisakkaritler ile kemik iliği stroma hücresi yüzeyinde bulunan E-cadherin etkileşimlerinin yanı sıra CD28, CD38, CD44, CD93, CD138 gibi yüzey proteinlerinin hücre-hücre ve hücre-matriks bağlantılarını sağlayarak plazma hücresinin kemik iliği mikroçevresinde tutunarak uzun süre hayatta kalmasını teşvik etmektedir [Nutt et al., 2015], [Shapiro-Shelef and Calame, 2005]. Kemik iliği stroma hücresi ile plazma hücresi arasında gerçekleşen etkileşimler Şekil 4.7’de şematik olarak gösterilmiştir [Shapiro-Shelef and Calame, 2005].

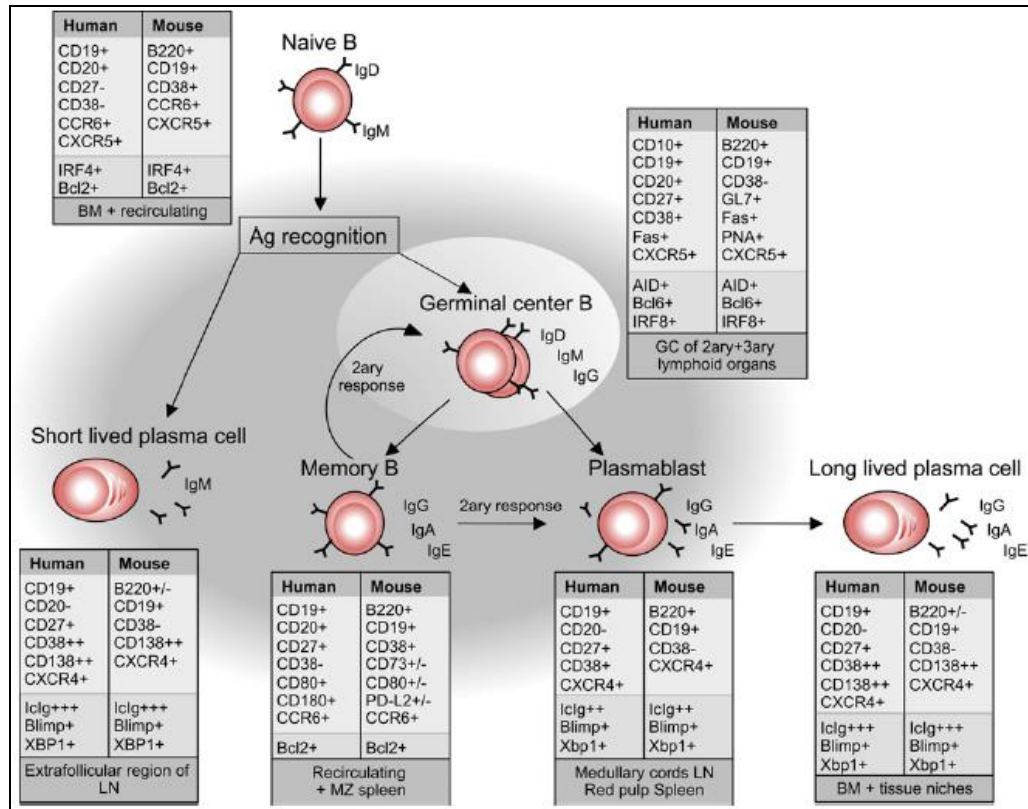


Şekil 4.7: Stroma hücresi ve plazma hücresi arasında farklı adezyon molekülleri vasıtasıyla gerçekleşen hücresel etkileşimler.

4.3. Plazma Hücresinin İmmünofenotiplendirilmesi

Hematopoetik kök hücrelerin olgun plazma hücrelerine farklılaşması hiyerarşik bir süreçtir ve bu gelişim basamakları farklı fenotipte hücre popülasyonlarının ortaya çıkmasına neden olur [Uckun, 1990]. Hücre içerisinde ifade edilen transkripsiyon faktörleri ve diğer proteinlerin yanı sıra BCR, Ig izotipleri, membran proteinleri gibi hücre yüzeyinde bulunan veya hücre dışına salgılanan proteinler ve bunların ekspresyon seviyeleri, bu hücre gruplarının birbirinden ayırt edilmesinde kullanılabilir [Hardy and Hayakawa, 2001]. Özellikle 1980’li yıllarda

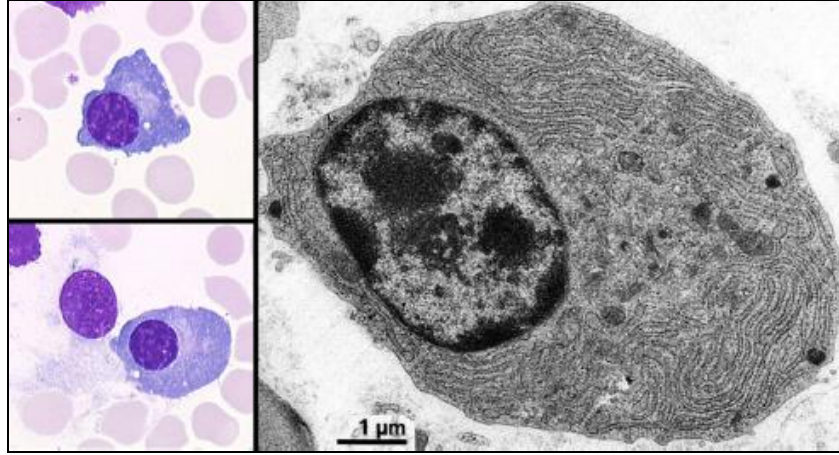
sınıflandırılması yapılan ve Clusters of Differentiation (CD) olarak adlandırılan yüzey belirteçleri, gelişimin farklı evrelerindeki hücrelerin özgün antikorlar kullanılarak karakterizasyonunun (immünfenotiplendirme) daha doğru ve standart bir zeminde yapılmasına imkan sağlamıştır [LeBien and Tedder, 2008]. Gelişimin farklı evrelerindeki plazma hücrelerinin immünfenotiplendirilmesinde kullanılan hücre içi proteinler ve yüzey belirteçleri Şekil 4.8’de şematik olarak gösterilmiştir [Dullaers et al., 2012].



Şekil 4.8: Farklı yüzey belirteçleri taşıyan plazma hücre popülasyonlarının immünfenotipik özellikleri.

Giemsa boyama sonrası ışık mikroskopunda, terminal farklılaşmasını tamamlamış olgun plazma hücrelerinde artan salgı kapasitesini karşılayabilmek için gelişen endoplazmik retikulum-golgi sisteminden dolayı sitoplazmanın geniş, nükleusun ise küçük ve hücrenin periferine doğru itilmiş olduğu görülür (Şekil 4.9) [Ribourtout and Zandecki, 2015]. Plazma hücrelerinin akım sitometrisi veya immünohistokimyasal yöntemlerle (İHK) tespitinde ise sıklıkla, hücre yüzeyinde ifadesi yüksek seviyede olan CD138 (Syndecan-1), CD27 ve CD38 gibi proteinler pozitif belirteç olarak kullanılırken, ifadesi oldukça düşük olan veya hiç olmayan

CD19, CD20, CD45 gibi membran proteinleri negatif belirteç olarak kullanılmaktadır [Robillard et al., 2014].



Şekil 4.9: Plazma hücresine ait Giemsa boyama sonrası ışık mikroskobu (solda) ve elektron mikroskop (sağda) görüntüleri.

4.3.1. CD138 (Syndecan-1)

CD138, insanda *SDC1* geni tarafından kodlanan, syndecan proteoglikan ailesinden bir transmembran (tip 1) heparan sülfat proteoglikandır (HSPG) [O'Connell et al., 2004]. İntegral membran proteini olan CD138, proliferasyonda, hücre göçünde, sitokinlerle bağlanarak hücre sağ kalımında ve ekstraselüler matriks (ECM) proteinlerine bağlanarak hücre-yüzey etkileşiminde rol oynar [Gharbaran, 2015], [McCarron et al., 2017], [Zong et al., 2011]. Epitelyel hücrelerde ve plazmablastlarda ekspresyonu bulunmasına rağmen CD138 ifadesi, antikor salgılayan plazma hücrelerinde yüksek seviyede bulunur [Szatmari and Dobra, 2013]. Bu sayede CD138, sağlıklı ve habis plazma hücrelerinin tespitinde en çok kullanılan yüzey belirteçidir [O'Connell et al., 2004]. Borset ve arkadaşlarının yaptığı çalışma CD138'in farklı MM hücre hatlarının yüzeyindeki dağılımının bazı hücrelerde polarizasyon (kutuplaşma) gösterdiği ve uropod adı verilen membran yapısında lokalize olduğunu ortaya koymuştur. Bununla birlikte CD138'in yerleşiminde görülen polarizasyon fenotipi ile miyelom hücrelerinin migrasyonu ve hareket potansiyelinin pozitif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir [Borset et al., 2000].

4.4. B Lenfosit ve Plazma Hücresi Kökenli Kanserler

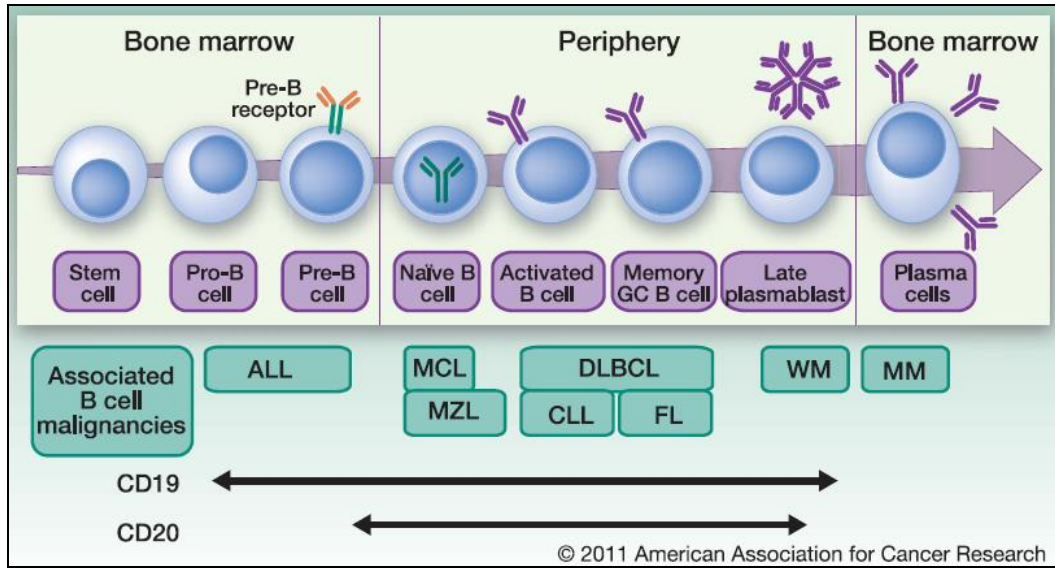
Plazma hücreleri, HKH'den köken alıp farklı gelişim basamaklarından (B hücre tipleri) geçerek terminal olarak farklılaşırlar ve belirli bir süre canlılıklarını devam ettirdikten sonra yaşam döngüleri tamamlanır [Nagasawa, 2006]. Gelişimin farklı evrelerinde bulunan hücre tipleri, farklı B hücre ve plazma hücre tümörlerini meydana getirme potansiyeline sahiptir ve meydana gelen bu habis (malign) hücreler genellikle köken aldıkları hücre tipinin temel karakterlerini sergilemeye devam ederler [Seifert et al., 2013]. Aşırı BCR/Ig aktivasyonuna bağlı olarak mikroçevreden gelen yaşam ve proliferasyon sinyallerine olan hassasiyetin artması, hücre içi sinyal yollarının bozulması, yoğun klonal proliferasyon, hücre ölüm ve seleksiyon mekanizmalarının sekteye uğraması, viral enfeksiyonlar, SHM mekanizmasındaki aksaklıklar sonucu kuvvetli promotöre sahip Ig gen segmentleri ve onkogenler arasında gerçekleşen resiprokal translokasyonlar ve DNA'da meydana gelen diğer mutasyonlara bağlı olarak B lenfositlerinin ve plazma hücrelerinin malign transformasyonu sonucu ortaya çıkan hematolojik kanserler, temel olarak lösemiler, lenfomalar ve miyelomlar olmak üzere üç grupta sınıflandırılır [Kuppers, 2005], [Rossi et al., 2005]. B hücre ve plazma hücre kanserlerinin gelişim sırasında köken aldığı hücre serileri Şekil 4.10'da gösterilmiştir [Blanc et al., 2011].

Lösemiler, kemik iliğinde bulunan miyeloid veya lenfoid seri hücrelerinden (lökositler) köken alarak kemik iliği ve/veya kan dokusunu etkileyen tümörlerdir [Pokharel, 2012]. Erken B hücre serilerinden köken alan B-hücre akut lenfoblastik lösemi (B-ALL), naif B veya hafıza B hücrelerinden köken alan B-hücre kronik lenfositik lösemi (B-CLL) ve hafıza B hücrelerinden köken alan B-hücre prolenfositik lösemi (B-PLL) B lenfositlerinin malign transformasyonu sonucu meydana gelen lösemilere örnektir [Mitchell et al., 2012], [Taylor et al., 2017].

Lenfomalar, lenfositlerin (T, B ve NK hücreler), normal lenfositlere göre daha hızlı çoğalmaları veya daha uzun yaşamaları sonucu lenf dokularında meydana gelen habis tümörlerdir [Kuppers, 2005]. Lenf folikülünün dış kısmında yerleşmiş olan naif B hücrelerinden köken alan mantle zon B-hücre lenfoması (MCL), marjinal zonda bulunan B hücrelerinin oluşturduğu marjinal zon lenfoma (MZL), germinal merkezde bulunan heterojen B hücre popülasyonlarından köken alan diffüz büyük B

hücreli lenfoma (DLBCL) ve Burkitt's lenfoma (BL) dünya genelinde sık görülen lenfomalardır [Kuppers, 2005], [Ondrejka and Hsi, 2015].

Olgun plazma hücreleri (CD138⁺) veya onların öncül hücreleri olan plazmablastlardan köken alan hematolojik kanserler ise miyelom olarak adlandırılır [Paino et al., 2014]. Habis plazma hücrelerinin kontrolsüz çoğalması sonucu kemik iliğini istila etmesinden dolayı meydana gelen multiple miyelom veya kemik iliği kanseri olarak bilinen bu tümörler genellikle yavaş ilerler ve yaşa bağlı olarak ortaya çıkarlar [Agarwal and Ghobrial, 2013], [Matsui et al., 2004].



Şekil 4.10: B lenfositlerinin farklılaşması sırasında ortaya çıkan B/plazma hücre kaynaklı hematolojik kanserler ve hücresel kökenleri.

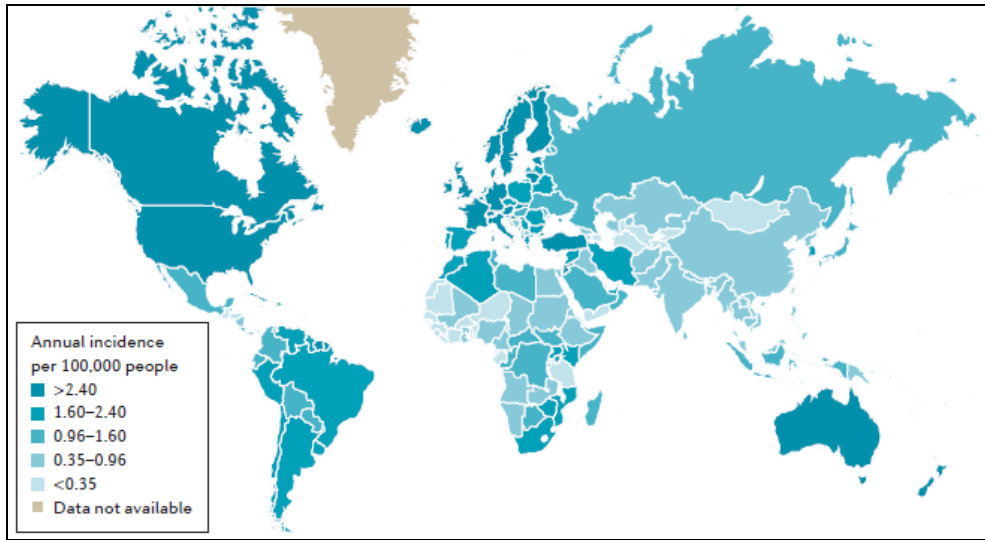
5. MULTİPLE MİYELOM

Multiple miyelom (MM), terminal farklılaşmasını tamamlamış plazma hücrelerinin kemik iliğinde anormal çoğalması sonucu değişen kemik iliği patolojisiyle tanımlanan genetik olarak karmaşık bir tümördür [Agarwal and Ghobrial, 2013], [Kuehl and Bergsagel, 2002]. MM, Amerika’da Non-Hodgkin lenfomadan sonra ikinci sırada görülen hematolojik kanser türüdür [Siegel et al., 2018]. Habis plazma hücreleri, çoğunlukla kemik iliğinde yerleşmiş olsa da özellikle hastalığın ilerleyen dönemlerinde metastatik faaliyetlerin artmasıyla periferik kanda veya yumuşak doku ve organlarda da MM hücrelerine rastlanabilmektedir. MM hücrelerinin sitolojik ayırımı farklı yüzey belirteçleri kullanılarak yapılırken; MM teşhisi ve takibinde anormal plazma hücreleri tarafından salgılanan işlevsiz bir monoklonal antikor olan paraprotein (M-protein) kandaki seviyesinin yanı sıra farklı klinik ve genetik belirtilerden faydalanılmaktadır [Gerecke et al., 2016], [Maniatis, 1998]. Onkogenler ve güçlü promotörlere sahip Ig gen kümeleri arasında meydana gelen kromozomal translokasyonlar [Bergsagel et al., 2005], [Gonzalez et al., 2007], Retinoblastoma 1 (RB1) gibi tümör baskılayıcı genlerde heterozigotluk kaybına (LOH, Loss of Heterozygosity) neden olan kromozomal delesyonlar [Morgan et al., 2012], [Walker et al., 2010], bazı kromozom bölgelerinde (6p22.3, 1q gibi) meydana gelen kopya sayısı artışları ve önemli sinyal yollarında yer alan bazı proteinleri kodlayan genlerde meydana gelen nokta mutasyonları MM hastalarında sıklıkla görülen genetik değişiklikler arasında yer almaktadır [Chapman et al., 2011]. Plazma hücrelerinde meydana gelen çok sayıdaki genetik değişiklik, heterojen tümör hücresi popülasyonlarının yanı sıra birbirinden farklı MM hasta profillerinin ortaya çıkmasına neden olmakta ve hastalığın tedavisiyle ilgili ortak stratejiler geliştirilmesine engel olmaktadır [Kyle and Rajkumar, 2009], [Matsui et al., 2008].

5.1. MM Epidemiyolojisi

MM, Amerika’da görülen tüm kanserlerin yaklaşık %1,7’sini ve kanser kaynaklı ölümlerinin %2’sini; hematolojik kanserlerin ise %13’ünü ve bu kanserlerden sebeplenilen ölümlerin ise yaklaşık %20’sini oluşturmaktadır

[Zweegman et al., 2014]. Nedeni henüz bilinmemekle birlikte, MM görülme sıklığının (insidans) Amerika'da yaşayan beyaz tenlilere kıyasla siyah tenli insanlarda daha yüksek, dünya genelinde ise batı ülkelerine oranla Asya popülasyonlarında daha düşük olduğu görülmüştür [Huang et al., 2007], [Waxman et al., 2010]. Şekil 5.1'de MM'un dünya genelinde görülme sıklığı harita üzerinde gösterilmiştir [Kumar et al., 2017]. MM bir ileri yaş kanseridir ve Avrupa'da erkeklerde ortalama görülme yaşının 71, kadınlarda ise 72 olduğu rapor edilmiştir [Turesson et al., 2010]. MM hastalarının geleneksel ilaç tedavilerinden sonraki ortalama yaşam süreleri 3-4 yıl, otolog kök hücre transplantasyonundan sonraki ortalama yaşam süreleri ise 5-7 yıldır [Raab et al., 2009]. MM seyri ve tedavisi ile ilgili hücresel mekanizmaların ve ilaçların bulunması; bulunan bu ilaçların tek başına veya diğer ilaçlarla kombinasyonel klinik uygulaması, MM hastalarının tedavi ve yaşam sürelerini değiştirebilmesi açısından önem arz etmektedir.



Şekil 5.1: 2012 yılına ait MM insidansının dünya genelindeki dağılımının haritalanması.

5.2. MM Gelişim Evreleri ve Teşhisi

MM genetik değişimlerin zaman içerisinde biriktiği, seyri yavaş ve buna bağlı olarak geç yaşlarda ortaya çıkan bir hematolojik kanserdir. Yaşa bağlı olarak görülen klinik belirtilere bağlı olarak MM, üç farklı gelişim evresinden geçerek oluşur. Hastalığın seviyelendirilmesinde ve sınıflandırılmasında iki farklı sistem kullanılmaktadır [Gerecke et al., 2016], [Kyle and Rajkumar, 2008]. Durie-Salmon

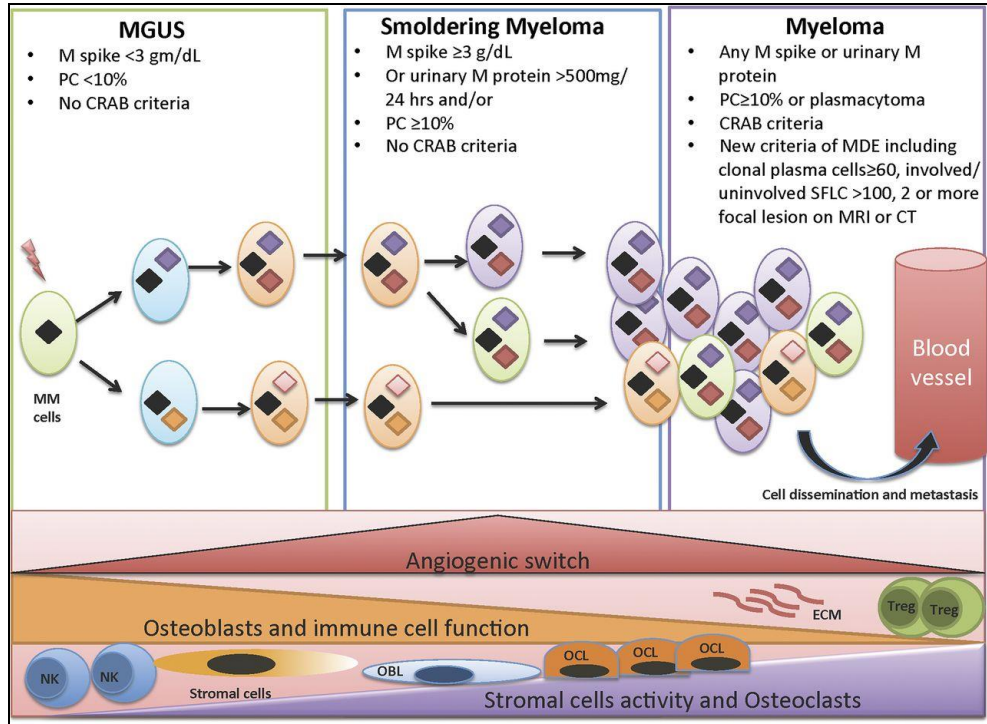
seviyelendirme sisteminde; kemik lezyonlarının varlığı ve derecesi, kandaki M-protein miktarı, kandaki hemoglobin ve kalsiyum seviyesi olmak üzere dört farklı kriter kullanılırken, uluslararası seviyelendirme sisteminde (ISS) yalnızca kandaki beta 2-microglobulin (β 2-M) ve albümin miktarlarına göre seviyelendirme yapılmaktadır [Greipp et al., 2005], [Kyle and Rajkumar, 2009].

Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS), birincil (primer) genetik varyasyonların gerçekleştiği ve klinik semptomların daha az görüldüğü başlangıç evresidir. MM gelişiminin öncü hastalığı olarak kabul edilen bu safha iyi huylu (benign) olmasına rağmen, genetik varyasyonları taşıyan hücrelerin avantaj elde ederek klonal olarak çoğalması miyeloma zemin hazırlar [Wadhera and Rajkumar, 2010]. Ameika’da yapılan çalışmalar MGUS görülme sıklığının 30-49 yaş bireylerde %0,1-0,2, 50-79 yaş bireylerde %1,1-2, 80 yaş üstü bireylerde ise %5,7 olduğunu ortaya koymuştur [Landgren et al., 2006]. MGUS’tan MM oluşma oranının senede %1 olduğu ve totalde MGUS hastalarının yaklaşık %15’inde ilerleyen yaşlarında MM olduğu rapor edilmiştir [Landgren et al., 2006], [Therneau et al., 2012]. Kemik iliğinde plazma hücre oranının -normalin (%0,1-%1) üstünde olsa da- %10’dan az olması, klonal çoğalmaya bağlı olarak Ig sentezinin tamamlanamaması sonucu meydana gelen monoklonal antikorun (paraprotein, M-proteini, miyelom proteini) serumdaki miktarının 3 g/dL’den az olması ve anemi, böbrek yetmezliği, kemik yıkımı gibi organ hasarlarının başlamamış olması MGUS’un klinik belirtileri arasındadır [van de Donk et al., 2016].

Smoldering Multiple Myeloma (SMM), MGUS ile MM arasında bir ara geçiş evresidir ve MM’un belirtileri tümüyle görülmediği için asemptomatik miyelom olarak da adlandırılır [Zingone and Kuehl, 2011]. SMM evresindeki hastalarda kandaki M-protein seviyesi 3 g/dL’nin, kemik iliğindeki plazma hücre oranı %10’un üzerine çıkar ve hafif derecede anemi oluşabilse de henüz böbrek yetmezliği, kemik yıkımı, hiperkalsemi gibi belirtiler görülmez [van de Donk et al., 2016].

Genetik varyasyonlara ek olarak kemik iliği mikroçevresi ile bozulan etkileşimlerin de katkısıyla malignant transformasyona uğramış plazma hücrelerinin klonal çoğalma avantajı baskın hale gelir ve tümör oluşumu hız kazanır [Hallek et al., 1998], [Zingone and Kuehl, 2011]. Kontrolsüz çoğalmanın sonucu olarak habis plazma hücrelerinin kemik iliğini istilasıyla teşhis edilen MM patolojisi oluşur ve hastalarda buna bağlı CRAB (Calcium increase, Renal insufficiency, Anemia, Bone lesions) adı verilen semptomlar görülmeye başlar [Gerecke et al., 2016]. MM

hastaları, belirtilerin şiddetine ve seyrine bağlı olarak üç farklı klinik evrede (I, II, III) değerlendirilir ve tedavi stratejisi uygulanır [International Myeloma Working, 2003]. Bozulan hücresel ve parakrin etkileşimlere bağlı olarak kemik yıkımından sorumlu olan osteoklastların aktivasyonu sonucu meydana gelen litik kemik lezyonları [Papadopoulou et al., 2010], kemik yıkımına bağlı olarak kandaki kalsiyum seviyesinin artması (hiperkalsemi) [Oyajobi, 2007], kemik iliğinde artan plazma hücre oranına bağlı olarak ($\geq 10\%$) kan hücrelerinin üretiminin aksaması sonucu görülen orta ve ağır şiddette anemi [Mittelman, 2003], M-protein seviyesinin serum ve idrardaki artışı gibi semptomlar MM teşhisinde kullanılan klinik belirtilerdir [Dispenzieri et al., 2009]. MM aşamaları ve belirtileri Şekil 5.2’de özetlenmiştir [Ghobrial and Landgren, 2014].



Şekil 5.2: MM seyri boyunca hastalığın seviyesine bağlı olarak ortaya çıkan klinik belirtiler.

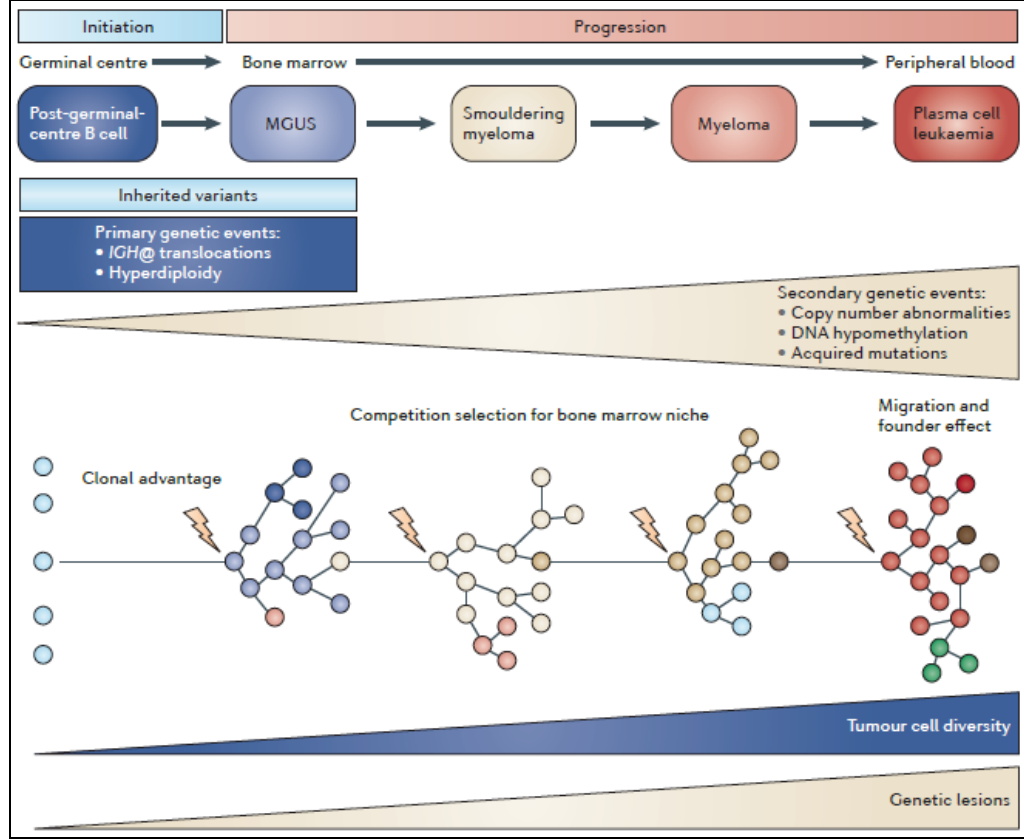
5.3. MM Patogenezi ve Moleküler Mekanizmalar

MM, genetik ve çevresel faktörlerin oluşturduğu karmaşık bir ağ tarafından kontrol edilen çok basamaklı bir gelişim sürecinden geçerek farklılaşan olgun plazma hücrelerinden ($CD138^+$) köken alan bir kanserdir [Matsui et al., 2004]. Bu nedenle

baştan sona plazma hücre gelişim süreci, MM patogenezinin başlamasına neden olan ve ilgili moleküler mekanizmaları tetikleyen faktörleri barındırmaktadır [Kumar et al., 2017]. Germinal merkezde Ig ağır zincirindeki genetik düzenlenmelere ve izotip değişimine izin veren CSR, antijenik afinitenin arttırılmasını sağlayan yoğun somatik mutasyonlar, olgunlaşan B lenfositlerinin seçilmesinde ve klonal delesyonunda apoptoz-proliferasyon arasındaki hassas dengenin bozulması, terminal farklılaşmadan önce durdurulması gereken hücre döngüsü kontrolünün ortadan kalkması, kemik iliği mikroçevresinden gelen yoğun sağ kalım sinyalleri gibi etkenler MM patogenezinin neden olan önemli plazma hücresi gelişim basamaklarındandır [Morgan and Kaiser, 2012], [Raab et al., 2009]. Birincil (primer) genetik varyasyonlar veya ilk vuruş (hit) olarak adlandırılan değişimler genellikle GC B hücrelerinde meydana gelir ve terminal farklılaşmanın hemen ardından değişen plazma hücre karakteri nedeniyle MGUS oluşması patogenezin ilk aşamasını oluşturur. Plazma hücrelerinde meydana gelen ikincil (sekonder) genetik varyasyonlar ve çevresel faktörlerin etkisiyle SMM oluşumuyla kademeli olarak devam eden patogeneze, MM oluşumu ile tamamlanmış olur [Fairfield et al., 2016], [Hallek et al., 1998].

Birincil genetik varyasyonlar arasında kalıtılmış SNP'ler (tek nükleotid polimorfizmleri), hiperdiploidiler ve IgH yeniden düzenlenmesi (CSR) sırasında meydana gelen kromozomal translokasyonlar yer alırken; kromozom kopya sayılarında meydana gelen değişimler, hücre döngüsü kontrolünün ortadan kalkması, proliferasyon ve apoptozla ilgili sinyal yollarında meydana gelen mutasyonlar, kromozomal translokasyonlar ve delesyonlar plazma hücrelerinde meydana gelen ikincil genetik varyasyonları oluşturur [Bianchi and Munshi, 2015], [Kuehl and Bergsagel, 2002]. MM patogenezinin ilerlemesinde lineer ve dallanmış olmak üzere iki farklı yolağın etkili olduğu düşünülmektedir [Morgan and Kaiser, 2012]. Hiyerarşik bir yapıya sahip olan lineer yolda birincil varyasyonların meydana geldiği tek bir hücrede, ilerleyen aşamalarda meydana gelen ikincil varyasyonlar MM oluşumu ile sonuçlanır. Daha çok kabul gören dallanmış yolda ise, birincil varyasyonun meydana geldiği hücreden yeni alt popülasyonlar meydana gelir [Morgan and Kaiser, 2012]. Bu alt popülasyonları oluşturan hücrelerde gelişimin ilerleyen evrelerinde yeni varyasyonların meydana gelmesiyle farklı mutasyonlar taşıyan yeni alt popülasyonlar oluşur. Sonuç olarak, ortak ve farklı genetik varyasyonların biriktiği popülasyonlardan köken alan habis plazma hücreleri

heterojen bir MM hücre popülasyonunun çoğalmasına neden olur [Bianchi and Ghobrial, 2014], [Furukawa and Kikuchi, 2015]. MM patogenezi ve MM heterojenitesi Şekil 5.3'te şematize edilmiştir [Morgan et al., 2012].



Şekil 5.3: MM patogenezi sırasında hücre heterojenitesine neden olan mekanizmalar.

5.3.1. Kalıtılmış Genetik Değişiklikler

Tüm kanser türlerinde olduğu gibi kalıtılan bazı genetik değişimlerin MM'a yatkınlığı artırdığı gösterilmiştir [Landgren and Morgan, 2014]. Yapılan çalışmalar özellikle 2p, 3p ve 7p olmak üzere üç kromozom bölgesinde meydana gelen değişimlerin MM riskini artırdığını ortaya koymuştur. MM patogenezindeki fonksiyonel rolleri bilinmemesine rağmen bu kromozom bölgelerindeki değişimlerin *DNMT3A-DTNB* (2p), *ULK4-TRAK1* (3p), and *DNAH11-CDCA7L* (7p) gen çiftlerini etkileyebileceği ortaya konulmuştur [Broderick et al., 2011].

5.3.2. Kromozom Translokasyonları

MM oluşumunu başlatan genetik faktörlerin ilkinin kromozomal translokasyonlar olduğu düşünülmektedir [Morgan et al., 2012]. Translokasyonlar, normal plazma hücresi gelişimi sırasında GC B hücrelerinde IgH zincirini kodlayan gen kümeleri arasında (CSR) gerçekleşir ve antikor izotipinin değiştirilerek farklı immün cevapların oluşturulması sağlanır. Bazen CSR mekanizmasındaki hatalar translokasyonların, güçlü promotörlere sahip Ig genleri ve malign transformasyona neden olabilecek önemli genleri içeren kromozom segmentleri arasında gerçekleşmesine neden olur [Stavnezer et al., 2008]. Bu sayede hücrede ekspresyonu belirli bir seviyede tutulan veya aktif olmayan genler kuvvetli Ig promotörünün transkripsiyonel kontrolü altına girerek aşırı ifade edilirler ve hücre karakterinin değişmesine neden olurlar [Gonzalez et al., 2007].

Bu hatalı translokasyonlardan en önemlileri t(4;14), t(6;14), t(11;14) ve t(14;16) kromozomal translokasyonlardır [Pratt, 2002]. Translokasyon t(4;14), 4p16.3 kromozom bölgesinde yerleşmiş olan hücre büyümesi ve bölünmesinde rol oynayan *FGFR3* (*Fibroblast Growth Factor Receptor 3*) ve transkripsiyon kontrolünde histon metiltransferaz olarak görev yapan *MMSET* (*MM SET Domain Containing*) genlerinin aşırı ifadesine neden olur [Kalff and Spencer, 2012]. Translokasyon t(6;14) ve t(11;14), *CCND3* (*Cyclin D3*) ve *CCND1* (*Cyclin D1*) protoonkogenlerinin aktivasyonu ve G1/S geçişindeki kontrolün ortadan kalkması ile sonuçlanır [Bergsagel et al., 2005]. Enzimatik aktivite için düzenleyici proteinler olan Cyclin D1 ve Cylin D3, CDK4/6 (Cyclin-Dependent Kinase 4/6) ile kompleks oluşturarak pRb'nin fosforilasyonuna ve E2F transkripsiyon faktörünün serbest kalmasına neden olur. Serbest kalan E2F, siklinlerin ve bölünme için gerekli bazı proteinlerin transkripsiyonunu gerçekleştirerek hücre döngüsünün ilerlemesini sağlar [Giacinti and Giordano, 2006]. Translokasyon t(14;16) ise bir diğer protoonkogen olan *MAF* geninin aşırı ifadesine ve dolaylı olarak (doğrudan siklin translokasyonuna neden olmadan) hücre döngüsü kontrolünün ortadan kalkmasına neden olur [Avet-Loiseau et al., 2011], [Bergsagel et al., 2005]. Maf (c-maf), *Cyclin D2*, *Integrin β 7* ve *CCR1* (*C-C Kemokin Reseptör 1*) gibi MM gelişiminde rol oynayan genlerin ifadesinde görev alan bir transkripsiyon faktörüdür. Cyclin D2 de pRb'nin aktivitesini kontrol eden Cyclin D-CDK4/6 kompleksine katılarak plazma hücrelerinin proliferasyonu artırırken; Integrin- β 7 ve CCR1'in habis plazma

hücrelerinin kemik iliğine adezyonunu ve mikroçevre ile arasındaki sinyal iletiminde rol oynayarak sağ kalımı ve proliferasyonu artırdığı gösterilmiştir [Annunziata et al., 2011], [Hurt et al., 2004]. İkincil genetik varyasyonlar arasında gösterilen ve MM hastalarının %10'dan azında tespit edilen t(8;14) translokasyonun ise *MYC* onkogeninin aşırı ifadesine neden olarak proliferasyona ve transformasyona neden olduğu gösterilmiştir [Bergsagel and Kuehl, 2001], [Dib et al., 2008].

5.3.3. Nokta Mutasyonları

Hematolojik kanserlerde de tespit edilen p53, p21, pRb, myc gibi tümör baskılayıcı genlerdeki ve onkogenlerdeki mutasyonlara ek olarak, tüm genom dizileme (WGS) çalışmaları, MM hastalarının farklı gen mutasyonları taşıdığını da ortaya koymuştur [Chapman et al., 2011]. Bu mutasyonlardan en sık rastlanana hücre büyümesi ve proliferasyonunda rol oynayan MAPK/ERK sinyal yolağında kritik öneme sahip *RAS* onkogenindeki mutasyonlardır [Lionetti et al., 2015]. MGUS hastalarında tespit edilememesine rağmen, MM olgularının yaklaşık %30'ünde *NRAS*, %26'sinde *KRAS* ve %22'sinde *BRAS* genlerinde (sıklıkla 12, 13 ve 61. kodonlarda) tespit edilen mutasyonlar, Ras'ın sürekli aktif formda kalmasına neden olarak proliferasyonu artırmakta ve MAPK/ERK yolağı üzerinden malign transformasyona neden olmaktadır [Kim et al., 2016]. Bu nedenle *RAS* mutasyonlarının özellikle MGUS-MM geçişinde fonksiyonel olabileceği düşünülmektedir [Chng et al., 2008]. Bununla birlikte MM hastalarının %13'ünde mRNA stabilitesinde ve transkripsiyon regülasyonunda görev alan bir poly(A) polimeraz kodlayan *FAM46C* geninde ve RNA işlenmesinde, degradasyonunda ve olgunlaşmasında rol oynayan Dis3 ekzonükleazı kodlayan *DIS3* geninde meydana gelen mutasyonların da MM patogenezi ve teşhisinde fonksiyonel olabileceği yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir [Weissbach et al., 2015], [Zhu et al., 2017].

5.3.4. Kromozom Kopya Sayısı Anomalileri

Bazı kromozom bölgelerinin kaybı veya yeni kopyalarının oluşması bu bölgelerde yerleşmiş olan DNA dizilerinin kopya sayısında değişikliklere yol açar ve tüm kanserlerde olduğu gibi kopya sayısı değişimleri MM'da da sıklıkla görülen anomaliler arasındadır [Munshi and Avet-Loiseau, 2011], [Shlien and Malkin, 2009].

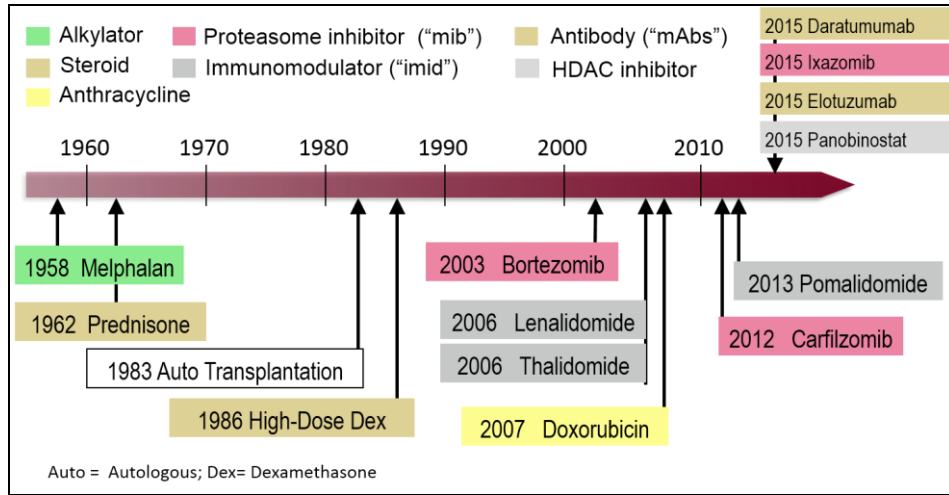
MM hastalarında tespit edilen bu kromozom anomalileri hastalığın patogenezinde, iyi veya kötü prognozunda ve teşhisinde sıklıkla belirteç olarak kullanılmaktadır [Munshi and Avet-Loiseau, 2011].

Kromozomal delesyonlar, ilgili segmentte lokalize olan genlerin kopya sayısını ve gen ekspresyon seviyelerini negatif etkileyerek genin fonksiyonunun ortadan kalkmasıyla sonuçlanır [Cai and Sablina, 2016]. Hastaların hemen hemen yarısında tespit edilen ve tümör baskılayıcı gen olan *RBI*'in fonksiyonunun ortadan kalmasıyla sonuçlanan 13q14 ve CDK'ları inhibe ederek hücre döngüsünün durmasını sağlayan *CDKN2C* (*Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor C*) geninin lokalize olduğu 1p32 delesyonları en önemli kromozomal parça kayıpları arasındadır [Leone et al., 2008], [Zojer et al., 2000]. 6q, 8p, 11q, 14q, 16q ve *TP53* geninin lokalize olduğu 17p kromozom delesyonları da MM vakalarında sıklıkla görülen diğer parça kayıplarıdır [Lode et al., 2010], [Morgan et al., 2012].

Bazı durumlarda kromozomun bir parçası bulunduğu bölgede tekrarlar oluşturur. Bu durumda tekrarlayan segmentte lokalize olmuş ve normalde hücrede iki kopya (allel) olarak bulunması gereken genlerin kopya sayısında artış meydana gelir. Kopya sayısında meydana gelen artış, gen ifadesinin artmasıyla sonuçlansa da bazı durumlarda gen ekspresyon düzeyi ve fonksiyonunu etkilememektedir [Durrbaum and Storchova, 2016], [Potapova et al., 2013]. MM hastalarında (>%40) en sık karşılaşılan 1q21 kromozom parçasındaki kopya sayısı artışıdır [Hanamura et al., 2006]. Tam olarak fonksiyonu bilinmese de MGUS hastalarında tespit edilemeyip sadece SMM ve MM hastalarında tespit edilmesi bu artışın hastalığın ilerlemesinde fonksiyonel olabileceği düşünülmektedir [Hanamura et al., 2006], [Rajan and Rajkumar, 2015]. Daha önce yapılan karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) çalışmaları, hastaların %20'sinde 11q, yaklaşık %10'unda ise 9q, 12q24, 15q23, 17q22-24, 22q kromozom bölgelerinde de kopya sayısı artışı olduğunu ortaya çıkarmıştır [Cigudosa et al., 1998], [Kuehl and Bergsagel, 2002]. Yakın zamanda yapılan genom tabanlı çalışmalarla 6. kromozomda da kopya sayısında artış olduğu tespit edilmiştir. Birleşik Krallık'ta (UK) yapılan çalışmada, 114 MM vakasının 19'unda (%16,6) 6p22.3-p21.31 kromozom bölgesinin (20,5 Mb, 657 gen) kopya sayısının arttığı; Çek Cumhuriyeti'nde yapılan CGH temelli çalışmada ise taranan MM hastalarının %8,7'sinde (9/91) 6pter-6p22.3 kromozom bölgesinde kopya sayısında artış tespit edildiği bildirilmiştir [Smetana et al., 2014], [Walker et al., 2010].

5.4. MM Tedavisi

MM tedavi stratejisine hastanın yaşı, hastalığın evresi, CRAB belirtilerinin şiddeti, varsa daha önce uygulanmış tedavilerin etkinliği gibi kriterler kullanılarak belirlenen risk sınıfına (standart, orta, yüksek) göre karar verilmektedir. Son elli yıl içerisinde yeni ilaçların keşfedilmesi ve tedavi yöntemlerinin gelişmesi MM tedavisinde de yeni uygulamaların ortaya çıkmasına katkı sağlasa da kemoterapi ilaçlarının tek başına veya birlikte kullanılması halen MM'un en etkin tedavi yöntemleri arasındaki geçerliliğini korumaktadır [Kumar et al., 2017]. Günümüzde yeni teşhis edilmiş MM tedavisinde sıklıkla uygulanan yöntem proteozom inhibitörleri ve bağışıklık sistemini düzenleyen ilaçların birlikte kullanılmasıdır. Bu kemoterapi kombinasyonuna en iyi örnek Bortezomib'in, Lenalidomide-Dexamethasone kombinasyonu (VRd) veya Thalidomide-Dexamethasone kombinasyonu ile kullanılmasıdır [Gerecke et al., 2016]. Bu ilaç kombinasyonundan sonra kök hücre nakli (Autologous Stem Cell Transplantation, ASCT) uygulamasının hastalardaki tedavi etkinliğini artırdığı bulunmuştur. MM tedavisinde kullanılan etkili ilaç gruplarından bir diğeri DNA alkilleyici ilaçlardır [Gerecke et al., 2016], [Kyle and Rajkumar, 2009]. Melphalan ve Cyclophosphamide gibi kemoterapi ilaçlarının gerek proteozom inhibitörleri gerekse bağışıklık sistemini düzenleyici ilaçlar ile birlikte kullanılması da MM tedavisinde etkin sonuçlar ortaya koymaktadır [Miguel et al., 2013], [Richardson et al., 2010]. MM tedavisinde kullanılan ilaçların kategorileri ve klinikte kullanılma kronolojileri Uluslararası Miyelom Kuruluşu'nun (International Myeloma Foundation) internet sayfasından alıntılanan Şekil 5.4'te özetlenmiştir [Web 2, 2018].

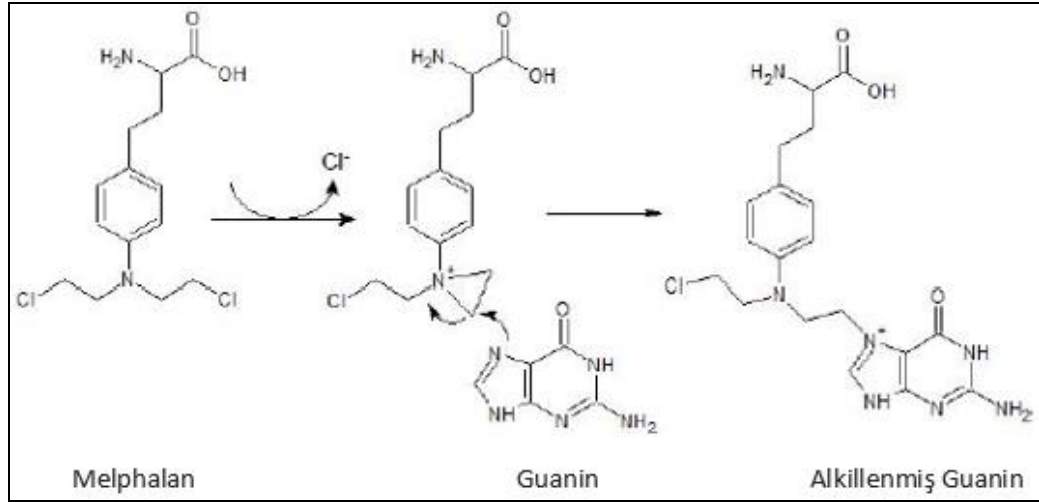


Şekil 5.4: MM tedavisinde kullanılan ilaçların kategorilendirilmesi ve klinikte kullanımı ile ilgili zaman çizelgesi.

Bir DNA alkilleyici ajan olan Melphalan (Alkeran®), ilk sentezlenen (1953) ve elli yılı aşkın süredir MM ve over kanseri tedavisinde kullanılmaya devam eden bir kemoterapi ilacıdır [Bayraktar et al., 2013], [Falco et al., 2007]. Günümüze kadar geçen sürede proteozom inhibitörleri, monoklonal antikolar, ASCT gibi ilaçlar ve tedavi yöntemleri geliştirilmiş olsa da bazı nedenlerden dolayı Melphalan, MM tedavisinde sıklıkla tercih edilen kemoterapi ilaçları arasındaki yerini korumaktadır. Bunlardan ilki alkilleyici özelliğinden dolayı özellikle hızlı bölünen hücrelerde DNA'yı hasara uğratarak tümör hücreleri üzerindeki yüksek sitotoksik etkisi, bir diğeri IL-6 ve dentritik hücre etkileşimlerini baskılayarak tümör mikroçevresi üzerindeki bağışıklık sistemini düzenleyici etkisidir [Esma et al., 2017], [Kuczma et al., 2016]. Bunların yanı sıra heterojen bir profile sahip olan MM'un tedavisinde, daha hassas fakat seçici ilaçların her zaman başarılı sonuç vermemesi, klinik güvenilirliğinin kanıtlanmış olması ve düşük maliyet gibi faktörler de Melphalan'ın kemoterapi stratejilerinde sıklıkla kullanmasının nedenleri arasındadır [Esma et al., 2017], [Rajkumar and Harousseau, 2016].

Kimyasal formülü 4-[bis(2-kloretil)amino]-L-fenilalanin ($C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$) olan Melphalan bir fenilalanin amino asidi türevidir ve bu sayede L-amino asit transport sistemi ile kolayca hücre içerisine alındıktan sonra yapısındaki kloretil grubu ile, guanin (G) bazının 7. pozisyonunda bulunan (imidazol halkası) azota kovalent olarak bağlanır [Millar et al., 1989], [Polavarapu et al., 2012]. Alkilasyon (alkil grubu ekleme) olarak tanımlanan bu reaksiyon sonucunda DNA'nın çift sarmal yapısı deformasyona uğrar. Bozulan üç boyutlu yapıdan ve alkil gruplarının varlığından

dolayı polimerazların (DNA/RNA polimeraz) DNA'ya bağlanamaması sonucunda replikasyon ve transkripsiyonun sekteye uğramasıyla Melphalan, hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermiş olur [Gkotzamanidou et al., 2014], [Polavarapu et al., 2012]. Melphalan'ın guanin bazının 7. pozisyonundaki azot molekülüne bağlanma reaksiyonu Şekil 5.5'te gösterilmiştir [Esmâ et al., 2017].



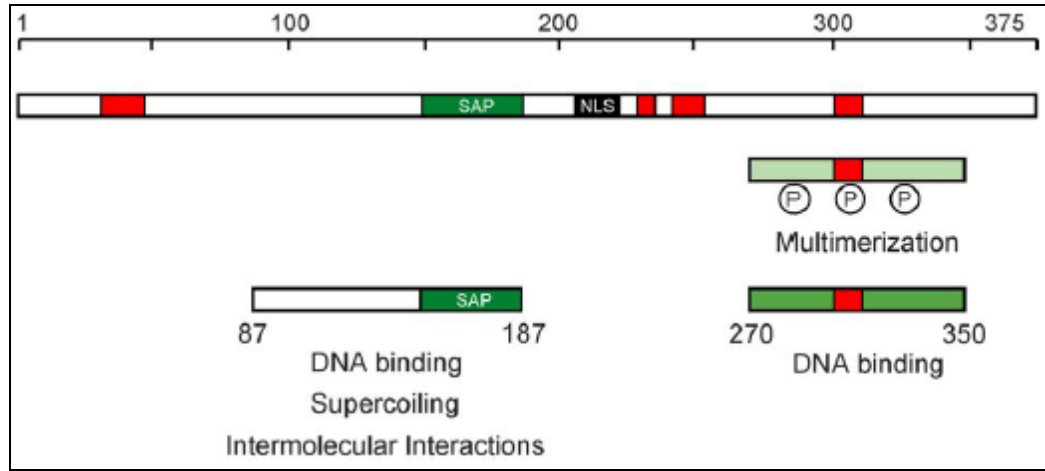
Şekil 5.5: Melphalan aracılığıyla gerçekleşen alkilasyonun kimyasal gösterimi.

6. DEK PROTEİNİ

DEK geni, türler arasında korunmuş olan 375 amino asitlik nükleer bir protein kodlamaktadır ve MM hastalarının yaklaşık %16'sında kopya sayısında artış olduğu tespit edilen 6p22.3 bölgesinde lokalizedir [Riveiro-Falkenbach and Soengas, 2010], [Walker et al., 2010]. İlk olarak akut miyeloid lösemide (AML) t(6;9)(p23;q34) translokasyonu sonucu oluşan DEK-CAN füzyon proteinin partneri olarak karakterize edilen DEK, çoğunlukla çekirdekte yerleşim göstermektedir [Saha et al., 2013], [von Lindern et al., 1992]. Bazı otoimmün hastalıklarda hücre dışına salgılandığı gösterilen DEK, kromozom topolojisi, mRNA kırılması, transkripsiyon kontrolü, DNA hasar tamiri ve replikasyon gibi birçok önemli hücresel süreçte rol almaktadır [Alexiadis et al., 2000], [Dong et al., 1998], [Kavanaugh et al., 2011]. AML, retinoblastom, hepatoselüler karsinom gibi bazı solid tümörlerde gen kopya sayısında ve/veya ifadesinde artış olduğu bildirilen DEK geni, melanom, meme kanseri gibi bazı kanserlerde de onkogen olarak tanımlanmıştır [Khodadoust et al., 2009], [Privette Vinnedge et al., 2015], [Riveiro-Falkenbach and Soengas, 2010].

6.1. DEK Proteininin Yapısı ve Lokalizasyonu

Moleküler ağırlığı yaklaşık 45 kDa olan DEK'in (375 amino asit) organizmalar arasında korunmuş farklı fonksiyonel domenleri (yapısal alt birim) keşfedilmiştir [Sanden and Gullberg, 2015]. DEK'in orta bölgesinde (87-187 amino asit) SAP-box domeni bulunur. Sarmal-dönüş-sarmal (helix-turn-helix, HTH) motifi içeren ve DNA'ya bağlanan proteinlerde bulunan bu domen DEK'in kromatine bağlanmasından sorumludur [Kappes et al., 2004b]. Buna ek olarak DEK'in karboksi ucunda bulunan (270-350 amino asit) DNA-bağlanma domeni de proteinin kromatine bağlanmasında fonksiyonel diğer yapısal alt birimdir. Karboksi ucunda bulunan ve DNA-bağlanma domeni ile örtüşen multimerizasyon domeni ise DEK'in birbiri (izoformları) ile bağlanarak protein dimeri (DEK-DEK) oluşumunda rol oynamaktadır [Kappes et al., 2004b], [Sanden and Gullberg, 2015]. DEK proteinin yapısında bulunan fonksiyonel alt birimler Şekil 6.1'de gösterilmiştir [Waldmann et al., 2004].



Şekil 6.1: DEK'in yapısında bulunan fonksiyonel alt birimlerin protein üzerindeki yerleşimlerinin gösterilmesi.

DEK'in, yapısında bulunan nükleer yerleşim sinyali sayesinde (NLS) hücre çekirdeğinde lokalize olduğu gösterilmiştir [Kappes et al., 2001]. Yapılan çalışmalar DEK'in hücre döngüsü boyunca çekirdekten ve kromatinden ayrılmadığını, mitotik kromozomlarda yerleşmiş histon-olmayan (non-histone) protein olduğunu ortaya koymuştur [Kappes et al., 2001], [Krithivas et al., 2002]. DEK'in önceden DNA üzerinde özgün nükleotid dizilerini seçerek bağlandığı düşünülse de son yapılan çalışmalar DEK-DNA etkileşiminin nükleotid dizisinden bağımsız olduğunu fakat DNA'nın üç boyutlu yapısı ile bağlantılı olduğunu göstermiştir [Waldmann et al., 2003]. Bu çalışmaya göre DEK'in gevşek ve lineer DNA bölgelerinden ziyade süper dönüm (supercoiled) oluşturmuş sıkı bölgeleri tercih edip bağlandığı sonucuna varılmıştır [Pease et al., 2015], [Waldmann et al., 2003]. U937 miyeloid hücre hattında yapılan bir başka çalışmada ise DEK'in H3K4 histon metilasyonunun olduğu ökromatin bölgelerinde ve buna paralel olarak farklı hücre tiplerinde ve dokularda sürekli ve çokça ifade edilen genlerin transkripsiyon başlama noktasına yakın bölgelerde biriktiği gösterilmiştir. Yapılan kromatin immün çöktürme (ChIP) deneyleri, bu bölgelerin DEK'e özel bir bağlanma motifi içermediğini göstermesinin yanı sıra bazı transkripsiyon faktörlerine özgün bağlanma motiflerinin yakınında yoğunlaşmasının DEK'in kromatin üzerindeki yerleşiminin başka proteinler ile düzenlenebileceğini düşündürmüştür [Sanden et al., 2014].

6.2. DEK Aktivitesinin Düzenlenmesi

6.2.1. Transkripsiyonel Kontrol

Altıncı kromozomun kısa kolunda (6p22.3) yer alan *DEK* geni, 11 ekzon ve TATA dizisi bulunmayan promotör bölgesi içermektedir. *DEK*'in transkripsiyonu, CpG adalarınca zengin bu transkripsiyon başlama bölgesine bazı transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasıyla kontrol edilmektedir ve *DEK* ifadesinin hücrenin fizyolojik durumuna bağlı olarak değiştiğinin yanı sıra transforme edilmiş veya kanser hücrelerinde *DEK* mRNA seviyesinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir [Waldmann et al., 2004].

DEK'in promotör bölgesi kullanılarak yapılan çalışmalar, transkripsiyon başlama noktasından 170 ve 135 baz uzaklıkta sırasıyla Nuclear Transcription Factor-Y (NF-Y) ve Yin Yang 1 (YY1) transkripsiyon faktörleri için bağlama dizileri bulunduğunu ve *DEK* transkripsiyonunda rol oynadığını ortaya koymuştur [Sitwala et al., 2002]. *DEK*'in ifadesinin proliferasyon ve transformasyondaki rolleri ortaya konulmuş olan bu iki transkripsiyon faktörü tarafından kontrol edilmesi, *DEK*'in aşırı ifadesi ve tümör gelişimi arasında mekanistik bir bağlantı olabileceğini düşündürse de, kanserlerde hangi üst sinyal yollarının NF-Y ve YY1 proteinlerini aktive ederek *DEK* ifadesini gerçekleştirdiği henüz bilinmemektedir [Riveiro-Falkenbach and Soengas, 2010]. İnsan papilloma virüs-pozitif (HPV-pozitif) serviks kanser hücreleri ve E7'nin aşırı ifade edildiği primer insan keratinositleri ile yapılan çalışmalar *DEK* transkripsiyonunun HPV onkogeni olan E7 tarafından da aktive edildiğini göstermiştir [Wise-Draper et al., 2005], [Wise-Draper et al., 2009].

Yapılan bir diğer çalışmada, Rb kaybı olan retinablastom ve küçük hücreli akciğer kanserinde *DEK* seviyesinin yüksek olduğu görülmüştür [Grasemann et al., 2005], [Riveiro-Falkenbach and Soengas, 2010]. Buna ek olarak, farklı tümör hücre hatlarında yapılan ChIP deneyleri, aktivitesi Rb tarafından kontrol edilen endojen E2F transkripsiyon faktörlerinin *DEK* promotörüne bağlandığı in vivo olarak gösterilmiştir. Aynı çalışmada *DEK*'in kolon, larinks, idrar kesesi kanserleri ve melanom gibi solid tümörlerde de aşırı ifade edildiği mikrodizin deneyleri ile ortaya konmuştur [Carro et al., 2006].

6.2.2. Translasyon Sonrası Modifikasyonlar

DEK'in aktivitesi ve fonksiyonun düzenlenmesindeki önemli post-translasyonel modifikasyonlar fosforilasyon, ADP-ribozilasyon ve asetilasyondur. Bölünen HeLa hücrelerinde hücre döngüsü boyunca DEK protein seviyesinde değişiklik olmamasına rağmen, G1 fazındaki DEK fosforilasyonunun S fazındakine göre iki kat daha fazla olduğu bulunmuştur [Kappes et al., 2004a]. Yapılan analizler DEK'in C-terminal ucunda bulunan dimerizasyon bölgesinde fosforilasyon bölgeleri (serin ve treonin bakiyeleri) bulunduğunu ve Casein Kinase 2'nin (CK2) DEK fosforilasyonundan sorumlu en önemli kinaz olduğunu açığa çıkarmıştır [Kappes et al., 2004a]. Fosforilasyonun, DEK'in DNA'ya bağlanmasını inhibe ederken, RNA kırılmasında görevli faktörlerle ve diğer nüklear proteinlerle etkileşimini artırdığı gösterilmiştir [Kappes et al., 2004a], [Soares et al., 2006]. Sirke sineğinde yapılan çalışmada CK2 tarafından fosforlanmış DEK'in, DEK-CK2 kompleksi şeklinde H3.3 histon ile birlikte bulunduğu ve şaperon gibi iş görerek nükleozom paketlenmesinde rol oynadığı ve böylece tükürük bezi hücrelerindeki politen kromozomlarının paketlenmesi için gereken ilmek oluşumunda etkili olduğu gösterilmiştir [Sawatsubashi et al., 2010].

DEK'in işlevlerini kontrol eden bir diğer post-translasyonel modifikasyon olan ADP-ribozilasyonun, genotoksik ajanlarla muamele sonucu apoptoza girmiş hücrelerde arttığı tespit edilmiştir [Kappes et al., 2008]. Toksik kimyasalların Jurkat hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarı ve strese cevaben çoklu DEK ribozilasyonunun Poly (ADPribose) polymerase 1 (PARP1) tarafından gerçekleştirildiği ve ribozillenmiş DEK'in kromatinden ayrılarak hücreler arası boşluğa salınarak otoantikor üretimini tetiklediği gösterilmiştir [Gamble and Fisher, 2007], [Kappes et al., 2008].

Asetilasyonun da DEK'in DNA afinitesini azaltan modifikasyonlar arasında yer aldığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Fosforilasyonun aksine DEK asetilasyonu, proteinin C-terminal ucunda değil, N-terminalinde bulunan yaklaşık 70 amino asitlik bir bölgedeki lizin bakiyelerinde gerçekleşir [Cleary et al., 2005]. Histon asetiltransferaz (HAT) domeni ve aktivitesi taşıyan CREB-Binding Protein (CBP), p300 ve p300/CBP-Associated Factor (P/CAF) tarafından asetillenen DEK'in, bağlı bulunduğu promotör bölgelerinden ayrılarak, RNA kırılmasında görevli olan proteinlerin ve transkripsiyon faktörlerinin yoğunlaştığı kromatin içi

granüllere (Interchromatin Granule Clusters, IGCs) göç ettiği tespit edilmiştir [Cleary et al., 2005]. Sonuç olarak post-translasyonel modifikasyonların çok farklı hücresel süreçte görev alan DEK'in DNA'ya bağlanma afinitesi ve fonksiyonlarının düzenlenmesinde bir anahtar gibi önemli rol oynadığı görülmektedir.

6.3. DEK'in Hücresel İşlevleri

DNA'ya bağlanan ve genellikle çekirdekte lokalize olan DEK'in farklı hücre tiplerinde birbirinden farklı hücresel süreçlerde rol oynadığı tespit edilmiştir. DEK'in bu işlevlerden bazılarının birbiri ile çelişmesine ve bazılarının ise hangi sinyallere bağlı olarak fonksiyonunu mekanistik olarak nasıl yerine getirdiği bilinmemesine rağmen DEK ile ilgili yapılan çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır.

6.3.1. DNA Topolojisi ve Kromatin Yapısının Değiştirilmesi

DNA'ya bağlanan protein olan DEK'in akla gelen fonksiyonlarının ilki DNA'nın ve kromatin yapısının değiştirilmesidir. Yapılan çalışmalar DEK'in DNA üzerinde farklı yapısal bölgelerde lokalize olabildiğini ve DNA topolojisi ile yakından ilgili olabileceğini göstermiştir [Waldmann et al., 2003]. DEK'in DNA topolojisi üzerindeki etkileri ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda, HeLa hücrelerinden izole edilen DEK'in SV40 minikromozomlarında (22-25 histon oktomeri ile paketlenmiş 5 kb viral genom) bulunan negatif ve pozitif süper dönümleri ökaryotik DNA topoizomerez I varlığında ortadan kaldırılmasında rol oynadığı *in vitro* olarak gösterilmiştir [Alexiadis et al., 2000], [Waldmann et al., 2002]. Ayrıca farklı histon kombinasyonları ile paketlenmiş DNA'lar kullanılarak yapılan deneyler sonucunda, H2A/H2B histon dimerinin nükleozomlarda bulunmasının DEK'in DNA'daki negatif süper dönümleri ortadan kaldırması için gerekli olduğu tespit edilmiştir [Alexiadis et al., 2000].

Sirke sineğinde (*Drosophila melanogaster*) yapılan çalışmada, DEK'in Heterochromatin Protein 1 α (HP1 α) ile doğrudan etkileşime girerek bu proteinin heterokromatik bölgelerin oluşmasında önemli olan metillenmiş H3K9 (H3K9me3) histonuna bağlanmasını artırdığı ve bu sayede heterokromatin yapısının korunmasında fonksiyonel olduğu gösterilmiştir [Kappes et al., 2011]. Bununla birlikte aynı çalışmada yapılan ChIP deneyleri HeLa S3 ve HEK293 hücrelerinde

DEK'in özgün shRNA'lar ile kalıcı olarak susturulmasının genel kromatin yapısında susturulmuş genlere ait promotörlerin yakınında bulunan H3K9me3 histonunu azalttığı, dolayısıyla DEK'in epigenetik susturma ilmeklerinin (epigenetic silencing loop) oluşmasında önemli bir role sahip olduğu bulunmuştur [Kappes et al., 2011].

DEK'in DNA topolojisi ile ilgili bir diğer önemli fonksiyonu kromatin modifiye edici komplekslerin aktivitesi üzerindeki düzenleyici rolüdür. Bunlardan en önemlisi DEK'in histon asetiltransferaz (HAT) komplekslerinin önemli parçası olan p300 ve P/CAF proteinleri üzerindeki baskılayıcı etkisidir. DEK'in histonlara bağlanarak p300 ve P/CAF kompleksleri tarafından gerçekleşen asetilasyonu inhibe ettiği ve bu sayede özellikle H3 ve H4 histonlarının hipoasetilasyonu sonucunda bazı genlere ait promotör bölgesini içeren kromatin bölgesinin yeniden düzenlenebildiği gösterilmiştir [Ko et al., 2006]. Farklı çalışmalarda yapılan immün çöktürme deneyleri DEK'in, kromatinin yeniden düzenlenmesini sağlayan WICH kompleksine (WSTF-SNF2h) bağlanan nüklear proteinlerden biri olduğunu ve fonksiyonu tam olarak bilinmese de DEK'in asetilenmiş H3, H4 histonları ve histon deasetilaz II'nin (HDAC II) de yer aldığı transkripsiyonel inhibitör kompleksi içerisinde yer aldığını ortaya koymuştur [Cavellan et al., 2006], [Hollenbach et al., 2002].

6.3.2. Transkripsiyon Kontrolü

Bazı transkripsiyon düzenleyicileri ile birlikte doğrudan veya kromatin yapısını değiştirerek dolaylı olarak transkripsiyonun düzenlenmesi DEK'in önemli işlevleri arasındadır. Yapılan çalışmalar DEK'in hücrelerde hem bir transkripsiyonel aktivatör hem de inhibitör olarak görev yaptığını ortaya koymuştur [Sanden et al., 2014]. Özellikle bir önceki başlıkta anlatılan DEK'in kromatin organizasyonu ile ilgili fonksiyonlarının, promotör bölgelerindeki yapısal değişikliğe bağlı olarak bazı genlerin transkripsiyonunu etkilediği görülmüştür. Bu dolaylı etkilere ek olarak DEK'in, U-87 MG glioblastom hücre hattı kullanılarak yapılan çalışmalarda hücre farklılaşması ve gelişiminde transkripsiyonel aktivatör olarak görev yapan Activating Enhancer-Binding Protein 2 Alpha (AP-2 α) ile bağlandığını ve transkripsiyon faktörünün aktivitesini artırdığı tespit edilmiştir [Campillos et al., 2003]. Bunun yanı sıra DEK'in, miyeloid hücre farklılaşmasında rol oynayan CCAAT-enhancer-binding Proteina (C/EBP α) transkripsiyon faktörü ile birlikte ilgili genlerin ifadesinde görev aldığı bildirilmiştir [Koleva et al., 2012].

6.3.3. DNA Onarımı ve Hücre Ölümü

Birçok kanser türünde DEK'in ifadesinin fazla olduğu ve ve tümörlerin genotoksik ilaçlara direncinden dolayı apoptozdan kaçtığı görülmüştür [Kavanaugh et al., 2011]. Bu bilgiyle bağlantılı olarak yapılan çalışmalar DEK'in DNA onarımı ve apoptozda da rol oynadığını ortaya koymuştur. Kanser hücre hatları, embriyonik fare fibroblast hücreleri (MEFs) ve fare modeli kullanılarak yapılan çalışma DEK'in, homolog olmayan uç birleşmesi (NHEJ) sürecinde DNA tamir proteini olan Ku70/80 dimerinin DNA-dependent Protein Kinase (DNA-PK) aracılığıyla yolağa dahil edilmesi için gerekli olduğunu göstermiştir [Kavanaugh et al., 2011], [Pease et al., 2015]. Ayrıca DEK'in çift zincir kırıklarının (DSB) onarımında görevli RAD51 ile kompleks oluşturarak NHEJ sürecinde rol oynadığı ve apoptoza hassasiyetinin arttığı bildirilmiştir [Smith et al., 2017].

HeLa hücre hattı ve primer insan keratinositlerinde DEK ifadesinin özgün shRNA'lar ile susturulmasının tümör baskılayıcı protein olan p53'ün stabilizasyonunu ve böylece p53-bağımlı apoptozu artırdığı tespit edilmiştir [Wise-Draper et al., 2006]. Diğer taraftan insan melanosit ve melanom hücrelerinde yapılan çalışmalar DEK'in p53 seviyesini etkilemediğini fakat antiapoptotik *MCL-1*'in ifadesini artırarak p53'ten bağımsız olarak apoptozu engellediğini göstermiştir [Khodadoust et al., 2009], [Pease et al., 2015].

6.3.4. Hücre Dışına Salgılanan DEK ve Kemoatraksiyon

Nüklear bir protein olan DEK bazı durumlarda hücre dışına salgılanabilmektedir. Juvenil artrit hastalarında CK2 tarafından fosforlanan DEK'in, serbest formda veya vezikül içerisinde makrofajlardan sinoviyal sıvıya salgılandığı ve nötrofiller, CD8⁺ T lenfositleri ile NK hücrelerinin göçünü sağlayan bir kemotaktik ajan olarak rol oynadığı bildirilmiştir [Mor-Vaknin et al., 2006], [Withrow et al., 2016]. Bir diğer çalışmada DNA onarımında rol oynayan DEK'in, apoptotik Jurkat hücrelerinde poli-ADP ribozilasyonu sonucu kromatinden ayrılarak hücreler arası boşluğa salgılandığı ve saflaştırılan modifiye DEK'in juvenil romatoid/idiopatik artrit hastalarının sinoviyal sıvılarından elde edilen otoantikorlar tarafından tanındığı bulunmuştur [Kappes et al., 2008]. Hücre dışına salgılanan DEK'in komşu hücreler tarafından nasıl alındığı ve işlevini koruyup korumadığı da

yapılan çalışmalarla test edilmiştir. Besi ortamına eklenen ve HeLa hücreleri tarafından heparan sülfat proteoglikan (HSPG) molekülleri vasıtasıyla hücre içerisine alınan rekombinant DEK proteininin, DNA onarımında ve kromatin organizasyonunda rol oynayarak işlevini koruduğu görülmüştür [Saha et al., 2013].

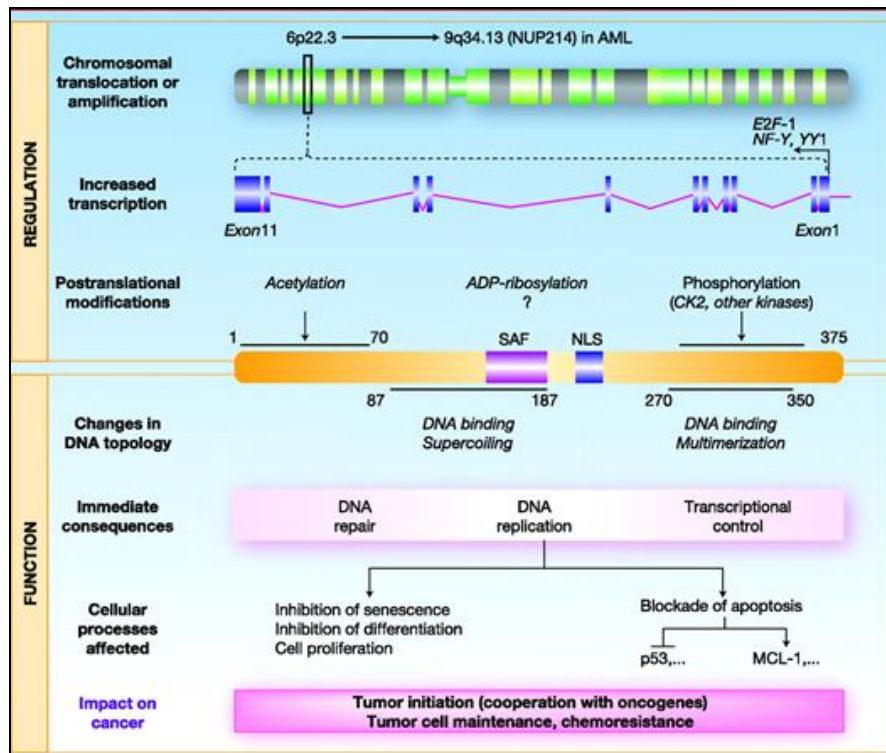
6.4. DEK'in Hematopoezdeki Rolü

Transkripsiyon kontrolü, kromatin yapısı ve NHEJ gibi temel ve önemli hücre içi işlevlere sahip olan ve DEK-CAN füzyon proteininin akut miyeloid lösemi patogenezinde rol oynayan DEK'in, normal hematopoez sürecinin belli aşamalarında ve özellikle miyeloid hücre farklılaşmasında da etkin rol oynadığı görülmüştür [Logan et al., 2015], [von Lindern et al., 1992]. Yapılan analizler AML hastalarında ifadesi kontrol kemik iliğine göre daha düşük seviyede olan DEK'in sağlıklı kan hücrelerindeki ekspresyonunun değişkenlik gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Periferik kanda ve kemik iliğinde bulunan HKH'lerde yüksek olan DEK ekspresyonunun, progenitör hücrelerin miyeloid seri hücrelerine farklılaşması sırasında belirgin bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir [Logan et al., 2015]. Miyeloid hücrelerinin farklılaşmasındaki önemli transkripsiyon faktörlerinden olan C/EBP α , hücre döngüsünü düzenleyen proteinlerle (CDK2/4, p21, E2F ve pRb gibi) etkileşime girerek proliferasyonu inhibe ederken, aynı zamanda miyeloid seri hücrelerinde önemli olan hedef genleri (*CEBPE*, *GCSFR3*, *MPO*, *ELA*, *LF*, *mim-1*, *miR34 α vb.*) aktive ederek miyeloid hücre farklılaşmasını kontrol eder [Cammenga et al., 2003], [Porse et al., 2005]. DEK'in kromatin üzerinde C/EBP α ile bağlanarak hedef genlerin transkripsiyonunda rol oynadığı ve multipotent CD34⁺ progenitör hücrelerinin farklılaşmasını uyararak granülositik hücre kolonilerinin (CFU-G) oluşması için gerekli olduğu gösterilmiştir [Koleva et al., 2012]. Broxmeyer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, DEK'in HKH'lerin proliferasyonunu artırdığı; CFU-GM (colony forming unit-granulocyte macrophage, BFU-E (burst forming unit-erythroid) ve CFU-GEMM (colony forming unit-granulocyte erythroid macrophage megakaryocyte) gibi farklılaşma seviyesi ilerlemiş hematopoetik progenitör hücrelerinin fare kemik iliği ve dalağında sayısını ve yerleşimini azalttığı tespit edilmiştir [Broxmeyer et al., 2012], [Broxmeyer et al., 2013]. Sadece hücre içi değil, hücre dışına salgılanan DEK'in kemotaktik işlevi sayesinde nötrofiller, CD8⁺ T

lenfositleri ile NK hücreleri gibi enflamasyonla ilgili kan hücrelerinin göçünü sağladığı da bilinmektedir [Mor-Vaknin et al., 2006].

6.5. DEK ve Kanser İlişkisi

Kanser bilindiği üzere hücrelerin kontrol dışı çoğalması sonucu invazyon ve metastazla sonuçlanan bir hastalıktır. Hücrelerin büyüme ve çoğalmasının kontrolü proto-onkogen adı verilen ve hücre döngüsü/proliferasyon, hücre ölümü, DNA tamiri veya gen ifadesi gibi önemli süreçlerde görev alan sinyal molekülleri ve düzenleyici proteinler tarafından sağlanır. İlgili genlerde meydana gelen mutasyonlar veya fonksiyonel aktivitenin değişmesine neden olan faktörler bu proteinlerin onkogenik karakter kazanarak tümörün başlamasına neden olurlar [Lee and Muller, 2010]. Bahsedildiği üzere kromatin organizasyonu ve transkripsiyondaki düzenleyici fonksiyonları, DNA tamiri üzerindeki pozitif etkisi ve apoptozu inhibe edici rollerinin yanı sıra bazı kanserlerdeki yüksek ekspresyonu ve transformasyonu indüklemesinden dolayı DEK, literatürde onkogen olarak tanımlanmıştır [Pease et al., 2015]. DEK'in hücresel işlevleri ve kanser ile ilişkisi Şekil 6.2'de şematik olarak özetlenmiştir [Riveiro-Falkenbach and Soengas, 2010].



Şekil 6.2: DEK'in kromozomal lokasyonu, yapısı ve fonksiyonlarının şematik özeti.

Hepatoselüler karsinom, beyin kanseri, idrar kesesi kanseri, retinoblastom, meme kanseri, serviks kanseri, melanom, kolon kanseri, sküamoz hücreli baş/boyun karsinomları ve prostat kanserigibi farklı solid kanserler ile kronik lenfosittik lösemi ve T-hücreli büyük granüler lenfosittik lösemi gibi hematolojik kanserlerde DEK ifadesinin arttığı ve bu kanserlerden bazılarında DEK'in tümör gelişimi ve ilaç direnci ile ilgili hücresel süreçlerle ilişkili olduğu bildirilmiştir [Pease et al., 2015], [Riveiro-Falkenbach and Soengas, 2010].

Khodadoust ve arkadaşları, 6p kromozom duplikasyonu olan farklı metastazik ve agresif melanom hücre hatlarında *DEK* ifadesinin de arttığını tespit etmişlerdir. Melanom hücre hatlarında *DEK* ifadesinin özgün shRNA'lar ile baskılanmasının hücrelerin proliferasyonunu azaltarak senesensi teşvik ettiği ve kullanılan genotoksik ilaçlara olan hassasiyete bağlı olarak hücre ölümünü artırdığı gösterilmiştir. Hücrelerdeki p53 miktarının *DEK* ifadesinden etkilenmemesine rağmen anti-apoptotik protein olan MCL-1 ekspresyonunu artırarak apoptozu engellediği görülmüştür [Khodadoust et al., 2009].

Çocukluk çağı retinoblastom hastalarında *RB1* kaybının yanı sıra 6p21–pter ve 1q31–q32 gibi kromozom bölgelerinde tespit edilen kopya sayısı artışlarına bağlı olarak *DEK* ve *E2F3* gibi onkogenlerin ifadesinde meydana gelen artışın tümör gelişimiyle ilgili olabileceği düşünülmektedir [Grasemann et al., 2005]. HN12 hücre hattında (sküamoz hücreli karsinom) yapılan çalışmalarla *DEK*'in hücre invazyonu ve cisplatin direncinde rol oynadığı gösterilmiştir [Sansing et al., 2011].

Wise-Draper ve arkadaşlarının yayınladığı çalışmada, *Dek*^{-/-} fare modelinde papillom oluşumunun yabani tip (WT) fareye göre daha geç olduğu, dolayısıyla *DEK*'in cilt tümörlerinin erken safhalarında etkin olabileceği kanısına varılmıştır. Yalnızca HPV16 E6/E7 ve hRas ile infekte edilen insan keratinositlerine (NIKS) oranla bu onkoproteinler ile birlikte aşırı ifadesi sağlanan *DEK*'in hücrelerin proliferasyonunu teşvik ederek koloni oluşumunu artırdığı; *DEK*'i aşırı ifade eden (E6/E7+hRas+*DEK*) keratinositlerin enjekte edildiği farelerdeki tümör oluşma oranı ve hacminin yalnızca E6/E7+hRas ekspresyonu olan keratinosit enjeksiyonuna oranla daha fazla olduğu, dolayısıyla *DEK* ekspresyonunun epitelial transformasyonu artırdığı *in vitro* ve *in vivo* olarak gösterilmiştir [Wise-Draper et al., 2009].

Akciğer nöroendokrin tümörlerinde 6p22.3 lokusunun kopya sayısının ve beraberinde *DEK* ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. Bu çalışmada küçük hücreli

akciğer karsinom hücre hatlarında (SBC3, SBC5) *DEK* ifadesinin susturulmasının (KD), *in vitro* deneylerde proliferasyonun ve koloni oluşumunun azalmasına, ilaç hassasiyetinin artmasına; fareye enjekte edilen *DEK* KD hücrelerinin kontrol hücrelerine oranla *in vivo* tümör oluşumunda ise düşüşe neden olduğu gösterilmiştir. Yapılan genetik analizler, bu hücrelerde *DEK*'in susturulması ile birlikte değişen (artan/azalan) genlerin sterol/lipit metabolizması, nükleozom/kromatin organizasyonu ile ilgili düzenleyiciler ve transkripsiyon faktörleri olduğunu ve bunların bazılarının lösemilerle ilgili genler olduğunu ortaya çıkarmıştır [Shibata et al., 2010].

Meme kanseri *DEK*'in ifadesinde artış tespit edilen bir diğer kanserdir. Tümör kökenli olmayan meme epitel hücre hattında (MCF10A) *DEK*'in aşırı ekspresyonu *in vitro* proliferasyon, sağ kalım, hücre göçü ve invazyonu artırırken, habis karakterde olan farklı meme kanseri hücre hatlarında (MDA-MB-468 ve MCF7) *DEK*'in lentiviral shRNA'lar ile baskılanması hücrelerin bu özelliklerinde ve kanserin ortaya çıkması ve tekrar etmesinde önemli olan kök hücre kümelerinde (mamosfer oluşumu) azalmaya neden olmuştur. Elde edilen *in vitro* bulgularla uyumlu olarak, farelere enjekte edilen *DEK* ifadesi baskılanmış MDA-MB-468 hücrelerinin kontrol grubuna göre tümör gelişimi ve hacminde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada *DEK*'in invazyon ve metastaz ile ilişkisine moleküler düzeyde ışık tutan bulgular da elde edilmiştir [Privette Vinnedge et al., 2011]. *E-cadherin* (*CDH1*) hücre-hücre adezyonunda rol oynayan bir tümör baskılayıcı gendir ve transkripsiyonel olarak Wnt/ β -catenin sinyal yolağı tarafından baskılanması veya fonksiyon kaybına uğraması hücre göçü, malignant transformasyon, metastaz veya invazyon ile sonuçlanmaktadır [Pecina-Slaus, 2003]. *DEK* ekspresyonu baskılanan MDA-MB-468 ve MCF7 hücrelerinde nukleusta lokalize olan aktif β -catenin miktarının azaldığı ve buna paralel olarak *CDH1* gen ifadesinin arttığı; *DEK*'i aşırı ifade eden MCF10A hücrelerinde ise bu profilin tam tersi olduğu tespit edilmiştir. *Dek*^{-/-} MEF hücrelerinde de MDA-MB-468 ve MCF7 hücrelerindeki benzer durumun olması *DEK*'in *E-cadherin* üzerindeki negatif regülasyonunun agresif kanserlerdeki metastazik ve invazif karakterin ortaya çıkmasına katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir [Privette Vinnedge et al., 2011].

DEK'in hepatoselüler karsinom (HCC) tümörogenezi ve metastazında da rol oynadığı Yu ve arkadaşlarının yakın zamanda yaptığı bir çalışmayla ortaya konulmuştur. İlk olarak yapılan ekspresyon analizi HCC tümör dokusunda ve farklı

HCC hücre hatlarında kontrollerine göre *DEK* gen ifadesinin daha yüksek olduğunu göstermiştir. *DEK*'in lentiviral shRNA'lar ile susturulması agresif invazif karaktere sahip olan SMMC7721 hücrelerinin proliferasyonunda ve *in vitro* migrasyonunda önemli ölçüde azalışa, hücre döngüsünde tutulmaya (arrest) ve bu hücrelerin enjekte edildiği farelerde tümör oluşumunda kontrole göre düşüşe neden olmuştur. Bununla birlikte *DEK* ifadesindeki baskılanmanın mezenkimal morfolojide olan SMMC7721 hücrelerinin epitel benzeri bir görünüm kazanması *DEK*'in epitelial-mezenkimal geçişte (EMT) etkili olabileceğini düşündürmüştür. İnvazyon potansiyeli daha düşük olan MHCC97L hücrelerinde *DEK*'in tanımlanan iki izoformunun ayrı ayrı ekspresyonu, hücrelerin *in vitro* proliferasyonunda, invazyonunda ve *CDK1*, *CDK2*, *CDK4*, *PCNA* gibi hücre döngüsünde rol oynayan genlerin ifadesinde artışa neden olmuştur. SMMC7721 hücrelerinde *DEK*'in baskılanması aktif β -catenin seviyesinde düşüş ve *CDH1* gen ifadesinde artışla; MHCC97L hücrelerinde her iki *DEK* izoformunun ifadesi ise tam tersi bir profille sonuçlanmıştır [Yu et al., 2016].

Matrka ve arkadaşlarının yaptığı çalışma birçok kanserde artan ve tümör gelişimiyle ilişkili olan *DEK*'in hücre metabolizması üzerindeki etkilerine ışık tutmuştur. Büyüme ve çoğalma hızındaki artışa bağlı olarak tümör hücrelerinin enerji ve makromolekül ihtiyacının da artması kanserin en tipik özelliklerindendir. Keratinosit (NIKs) ve baş/boyun sküamoz hücreli karsinom hücre hatlarında (C-SCC1) *DEK*'in aşırı ifadesinin NAD^+ , laktat, alanin gibi glikoliz ve fumarat, süksinat gibi TCA döngüsü ürünlerinin artışına neden olduğu gösterilmiştir. Enerji metabolizmasının yanı sıra glutaminoliz metabolitleri olan glutamin ve glutamat; membran yapılarında yer alan myo-inositol, GPC ve kolin; hücrel redoksta rol oynayan glutatyon; nükleotid sentez yollarında yer alan glisin, aspartat, glutamin ve format; protein ve lipid biyosentezinin yapı taşları olan diğer amino asitler ve TCA ara molekülleri gibi kritik öneme sahip hücre içi metabolitlerin de *DEK* ekspresyonundan etkilendiği rapor edilmiştir. Böylece bu güncel çalışmayla, *DEK*'in önemli metabolik yolları değiştirerek tümör hücrelerinin büyümesi ve çoğalmasına katkı sağlayabileceği ile ilgili yeni ve farklı bir model ortaya konulmuştur [Matrka et al., 2017].

6.6. DEK ve Multiple Miyelom İlişkisi

MM hastalarının yaklaşık %16'sında 6p22.3 kromozomal bölgesinde kopya sayısı artışı olduğu tespit edilmesine rağmen literatürde *DEK*'in lokalize olduğu bu kromozom bölgesindeki artışın *DEK* geninin kopya sayısını ve/veya ekspresyonunu etkileyip etkilemediğine dair bir bilgi mevcut değildi [Walker et al., 2010]. Daha önce laboratuvarımızda yürütülen yüksek lisans tezleri kapsamında yapılan çalışmalarda, taranan MM kemik iliği kesitlerinin yaklaşık %10'unda (4/41) CD138^{pozitif} plazma hücrelerinde DEK kopya sayısında artış olmasına rağmen mRNA seviyesinin bu artıştan etkilenmediği ve sağlıklı veya neoplastik CD138^{pozitif} plazma hücrelerinde İHK yöntemiyle tespit edilebilecek düzeyde DEK proteini bulunmazken B hücre kökenli tümör hücrelerinde DEK proteinin varlığı tespit edilmiştir [Çakar, 2014], [Özdilek, 2013].

Normal plazma hücre gelişiminde terminal farklılaşma öncesinde hücre bölünmesinin durdurulması için Blimp-1 tarafından baskılanan E2F1'in *DEK* geninin promotörüne bağlandığı bilinmektedir [Carro et al., 2006], [Shaffer et al., 2002]. Plazma hücre gelişimi ve hücre proliferasyonu için önemli olan bu transkripsiyonel ağ, DEK onkoproteini ile MM hücrelerinin anormal çoğalması arasında dolaylı bir ilişki olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte DEK'in gerek hematopoezin erken safhalarındaki proliferatif etkisi ve miyeloid hücre farklılaşmasındaki rolü gerek AML, CLL gibi hematopoetik kanserlerin yanı sıra solid kanserlerdeki artan ifadesi ve onkogenik özellikleri, DEK'in MM'da da muhtemel bir onkogen olarak rol oynayabileceği kanısını desteklemektedir.

7. MATERİYAL

Tablo 7.1: Hücre hatları.

Hücre Hattı	Firma	Katalog Numarası
RPMI 8226	ATCC	CCL-155
U266	ATCC	TIB-196
293T	Dr. Gerard Grosveld	

Tablo 7.2: Plazmitler.

Ürün	Firma	Katalog Numarası
pGFP-C-shLenti-shDEK p.	Origene	TL313507
MIG Retroviral vektör	Addgene	27490
Paketleme vektörleri	Dr. Gerard Grosveld	-

Tablo 7.3: Taqman Primer-Prob Setleri.

Ürün	Firma	Katalog Numarası
DEK, human	Applied Biosystems	Hs00180127_m1
CD138, human	Applied Biosystems	Hs00896423_m1
ACTB, human	Applied Biosystems	Hs01060665_g1

Tablo 7.4: Antikorlar.

Ürün	Firma	Katalog Numarası
Fare anti-insan DEK antikor	BD	610948
HRP-konjuge anti-fare IgG antikor	Cell Signaling	7076S
Tavşan anti-insan GAPDH antikor	Cell Signaling	5174P
HRP-konjuge anti-tavşan IgG antikor	Cell Signaling	7074P2
Anti-fare IgG Fab2 AlexaFlour 555	Cell Signaling	4409S
Fare anti-insan CD138-PE antikor	BD	552026
Fare anti-insan CD138 antikor (IHC)	Biocare Medical	CM167B
AP-konjuge anti-fare IgG antikor	Biocare Medical	MALP521G

Tablo 7.5: Kitler, Kimyasallar.

Ürün	Firma	Katalog Numarası
RPMI Medium	Gibco	22400-089
DMSO	Fisher Scientific	BP231-1
FBS	Gibco	26140-111
2-Propanol	Sigma-Aldrich	24137-2.5L-R
Polybrene	Sigma-Aldrich	H-9268
Kloroform	Sigma-Aldrich	24216-2.5L-R
PBS	Gibco	14190094
DMEM	Gibco	41966029

Tablo 7.5: Devam

Penicilin/Streptomycin	Gibco	151401
Pierce BCA Protein Assay	Thermo Scientific	23227
CaCl ₂ Transfeksiyon Kiti	Promega	E1200
Sodyum Chloride	Sigma-Aldrich	S7653-250G
Hydrogen Peroxide	Sigma-Aldrich	H1009-100ML
Sodium Phosphate Di.	Sigma-Aldrich	S7907-100G
HEPES	Sigma-Aldrich	H4034-25G
Calcium Chloride Dihyd.	Sigma-Aldrich	C7902-500G
Sodium deoxycholate	Sigma-Aldrich	D6750-10G
Trizma Base Reagent	Sigma-Aldrich	T1503-1KG
SDS	Sigma-Aldrich	L3771-100G
NaCl	Sigma-Aldrich	S7653-250G
BSA	Sigma-Aldrich	A2153-10G
Fibronektin	Sigma-Aldrich	S5171-5MG
NP-40	Applichem	A1694,0250
Formaldehit (%37)	Teknokim	TK.060162.05000
EDTA	Fisher Chemical	BP118-500
Giemsa Azure solüsyonu	Merck Millipore	109204
Yağsız süt tozu	Applichem	AB0830,0500
Beta-mercaptoethanol	Applichem	A1108.0100
High capacity cDNA Reverse	Applied Biosystems	4368814
2X Taqman Universal Master	Applied Biosystems	4324018
Ecomount Kapatma Maddesi	Biocare Medical	EM897L
Warp Red Chromogen	Biocare Medical	WR806CHE
Warp Red Chromogen Buffer	Biocare Medical	WR806BFH
Van Gogh solüsyonu	Biocare Medical	PD902JJ
Absolute Etanol	Sigma-Aldrich	32221
Ksilol	Sigma-Aldrich	16446
RNaz	Ambion	2272G4
Tryphan Blue	Invitrogen	T10282
Propodium Iodide (PI)	Invitrogen	P3566
Tripure Isolation Reagent	Roche	11667157001
WST-1 Proliferation Reagent	Roche	5015944001
SDS Yürütme Tamponu	Biorad	161-0732
4X Laemmli SDS Tamponu	Biorad	161-0747
Protein marker	Thermo Scientific	26616
TBS	ScyTek Laboratories	TBS999
Tween20	Sigma-Aldrich	P9416-50ML
Kemiluminisan (ECL)	Thermo Scientific	32132
Melphalan	Sigma-Aldrich	M2011-100MG
Metanol (%99.9)	Sigma-Aldrich	34885-2.5L-R
Proteaz/Fosfataz inhibitörü	Thermo Scientific	78440

Tablo 7.6: Cam, Plastik ve Sarf Malzemeler.

Ürün	Firma	Katalog Numarası
qPCR 96 kuyulu plaka	Axygen	321-75-051
6 kuyulu plaka	TPP	92006
Petri (100×20 mm)	TPP	93100
Flask 25/75/150 cm ²	TPP	90026/90076/90151
Thoma Lamı	Isolab	I.075.03.002
Mr. Frosty	Nalgene	5100-0001
Cell strainer/Filtre (40µm)	BD	352340
Pozitif yüklü lam	Thermo Scientific	9991001
Lamel (24 x 50 mm)	Fisher Scientific	12-540-A
Yapışkan Film	Applied	4306311
Şırınga ucu filtre (0.45 µm)	Life Sciences	4614
Şırınga ucu filtre (0.22 µm)	TPP	99722
PCR tüpleri	Axygen	PCR-02-C
Eppendorf Tüp	Axygen	MCT-060-C / 150-C
Pipet ucu	Axygen	BT10XL,20,200,1250
Parafilm	İsolab	058.01.001
Şale	Isolab	073.01.001
Kriyotüp	TPP	89012
Hazır Western Blot Membranı	Biorad	170-4159
Hazır Western Blot Jeli	Biorad	456-9033

Tablo 7.7: Cihazlar.

Ürün	Firma	Katalog Numarası
CO ₂ İnkübatör	Heal Force	HF90
Laminar flow kültür kabini	Cryste	Puricube 1200
qPCR analiz cihazı	Agilent	Stratagene
PCR (thermal cycler) cihazı	Bio-Rad	MJ-Mini PTC1148
Nanodrop	Shimadzu Biotech	206-26300-48
Cytospin4	Thermo Scientific	CY9064
Countess Hücre Sayım Cihazı	Invitrogen	1754B
Çalkalayıcı	Labnet	S2025-B-230V
Multi rötor	Biosan	Multi RS-60
FACS Jazz	BD	655487
Transblot Tranfer Sistemi	Biorad	
Varioskan Plate Reader	Thermo Scientific	3001-1571
Floresan mikroskobu	Nikon	Eclipse Ti-S
Chemi Doc XRS+	Biorad	721BR04545
Sıvı azot tankı	Taylor Wharton	LS4800
Ters(inverted) ışık mikroskobu	Nikon	Eclipse TS100
Su banyosu	Wisd Lab. Ins.	0400702135J036
Worteks	VWR International	444-1372
Santrifüj	Sigma	1-14
Ters Floresan mikroskobu	Nikon	Eclipse 80i
Işık mikroskobu	Nikon	Eclipse, E100
Mikropipet seti	Gilson	F167300

8. YÖNTEM

8.1. Hücre Kültürü

İnsan MM hücre hatları RPMI-8226 ve U266, ATCC tarafından önerilen kültür ortamında (FBS (%15, v/v) ve penisilin/streptomisin (%1, v/v) ilave edilmiş RPMI-1640 besiyeri, %5 CO₂, 37°C’de çoğaltılarak canlılıkları devam ettirildi. Retrovirüs çalışmalarında paketlenme hücre hattı olarak kullanılan 293T hücreleri ise DMEM besiyeri (FBS (%10, v/v), penisilin/streptomisin (%1, v/v) ilave edilmiş) kullanılarak %10 CO₂, 37°C’de nemli inkübatörde kültürlendi. Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler 1000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücre pelleti taze besiyeri içerisinde süspanse edildi ve uygun yoğunlukta ekilerek pasajlandı.

Dondurulmak istenen hücreler santrifüj edildikten sonra dondurma besiyeri (%10 DMSO içeren FBS) ile uygun yoğunlukta (maksimum 10x10⁶ hücre/ml) süspanse edildi. Cryotüpler içerisine alikotlanan hücre süspanسیونları “Mr. Frosty” (Nalgene) kapları içerisinde 24 saat -80°C’de kademeli olarak dondurulduktan sonra uzun süre muhafaza edilmek üzere sıvı azot tankına (-196°C) aktarıldı. Hücreler tekrar çözölmek istendiğinde, sıvı hale gelen süspanسیون üzerine büyüme besiyeri (yaklaşık 25 ml) kademeli olarak eklendikten sonra santrifüj edildi (1000 rpm’de, 10 dk.). Uygun miktarda taze besiyeri ile süspanse edilen hücreler inkübatöre kaldırıldı.

8.2. MM Hücre Hatlarına Gen Aktarımı

RPMI-8226 hücrelerinde endojen DEK ifadesinin baskılanması DEK’e özgün 4 farklı lentiviral kısa RNA (sh-RNA) kullanılarak; RPMI-8226 ile U266 hücrelerinde DEK’in aşırı ifadesi ise retroviral ekspresyon vektörü kullanılarak sağlandı. Öncelikle bu vektörler viral paketlenme plazmidleri ile birlikte 293T hücrelerine transfekte edilerek “self replication” kapasitesi olmayan virüs partikülleri üretildi. İkinci aşamada ilgili geni taşıyan virüsler toplanarak RPMI-8226 ve U266 hücrelerine viral transdüksiyon yapıldı ve bu hücrelerde DEK ifadesinin kalıcı olarak modifikasyonu sağlandı. İlgili gen ürünüyle birlikte kodlanan ve floresan bir protein olan Green Fluorescent Protein (GFP) ise, hem aşırı gen ifadesi (overexpression) hem de gen susturulması (knock-down) için kullanılacak olan vektörlerin başarıyla

aktarıldığı ve hedeflenen kalıcı ekspresyonun sağlandığı hücrelerin ayırt edilebilmesi amacıyla belirteç olarak kullanıldı. Aşırı gen ifadesi için transkripsiyonel kontrolün MSCV promotorü altında olduğu MIG (MSCV-IRES-GFP) vektörü tercih edildi. Bu plazmitin iskeletinde çoklu klonlama bölgesi ve GFP arasına denk gelecek şekilde IRES (Internal Ribosomal Entry Site) dizisi mevcuttur. Bu sayede sentezlenen proteinin stabilizasyonu ve fonksiyonunun etkilenmemesi amacıyla plazmit içerisine klonlanan DEK cDNA'sı ve GFP füzyon olarak değil birbirinden bağımsız transkriptler olarak ifade edilmektedir.

8.2.1. Viral Vektörlerin Paketleme Hücre Hattına Transfeksiyonu

Retroviral ekspresyon vektörleri ve DEK'e özgün lentiviral sh-RNA'lar, öncelikle CaCl₂ transfeksiyon metodu kullanılarak viral paketleme hücre hattı olan 293T hücrelerine aktararak virüs partikülleri üretildi (üretilen retrovirüs ve lentivirüsler "self-replication" kapasitesi olmayan, kullanımı güvenli virüslerdir). 293T hücrelerinin kültürlenmesinden virüs üretimi ve MM hücre hatlarının enfekte edilmesine kadar takip edilen protokol maddeler halinde özetlenmiştir:

- 293T Hücrelerinin Kültürü: 293T hücreleri, embriyonik (insan) böbrek epiteli kökenli olup yüksek gen aktarım verimliliğinden dolayı transfeksiyon çalışmalarında sıklıkla tercih edilen ve yüzeye yapışarak büyüyen (adherent) bir hücre hattıdır. Bu hücrelerin çoğaltılmasında bir önceki başlık altında belirtilen kültür koşulları kullanılmıştır.
- 1. Gün: Transfeksiyondan 24 saat önce, 293T hücreleri pasajlanarak 10 ml DMEM (%10 FBS+%1 Pen/Str) içerisinde 4×10^6 canlı hücre olacak şekilde 10 cm'lik petrilere ekildi.
- 2. Gün: Besiyeri hazırlamak için kullanılan FBS, 55°C'de 1 saat bekletilerek ısı ile inaktive edildi (Heat Inactivated, HI-FBS). Sonrasında %10 HI-FBS ve %1 Pen/Str eklenerek HI-DMEM hazırlanmıştır. Bir önceki gün petrilere ekilmiş hücrelerin besiyeri, transfeksiyondan 3 saat önce hazırlanan HI-DMEM (5 ml) ile değiştirildi. Üç saatin sonunda aktarılacak plazmid DNA'larını ve 2X HBS (Hepes Buffered Saline) içeren iki ayrı tüp hazırlandı (Tablo 8.1):

Tablo 8.1: 293T hücrelerinin transfeksiyonu için hazırlanan plazmid karışımları.

	I. Tüp	II. Tüp
sh-RNA (shDEK veya sh-Neg)	10 µg	X
Gp1R (Paketleme vektörü)	6 µg	X
RTR2 (Paketleme vektörü)	2 µg	X
VsVG (Paketleme vektörü)	2 µg	X
CaCl ₂ (2,5 M)	50 µl	X
2X HBS	X	500 µl
Steril dH ₂ O	500 µl'ye tamamlanır	X

DNA-CaCl₂ karışımı (I. tüp) hazırlandıktan sonra, II. tüpte bulunan 2X HBS üzerine damla damla eklenerek 30 dakika inkübe edildikten sonra transfekte edilecek hücrelerin üzerine damlatıldı ve petriler inkübatöre (%10 CO₂, 37°C) kaldırıldı.

- 3. Gün: Yaklaşık 18 saatlik inkübasyonun ardından petrilerde bulunan besiyeri vakumla uzaklaştırılarak 2 kez 5'er ml PBS ile yıkandı. Sonrasında her bir petriye 5 ml HI-DMEM eklenerek tekrar inkübatöre (24 saat) kaldırıldı.

8.2.2. Viral Transdüksiyon

Takip eden 4. günde virüs partikülleri içeren besiyeri şırınga yardımıyla çekilerek 0,45 µm filtreden geçirildi. Diğer taraftan viral transdüksiyon yapılacak RPMI-8226/U266 hücreleri (1,6x10⁶ canlı hücre) santrifüj (1000 rpm, 10 dakika) edildikten sonra hücre pelleti 2,5 ml RPMI 1640 besiyeri (%15 FBS+%1 Pen/Str) ile süspanse edildi. Her bir hücre süspanسیونuna final konsantrasyonu 8 µg/ml olacak şekilde Polybrene eklendikten sonra filtrelenmiş virüslü besiyerinden 2,5 ml ilave edilerek T-25 flaska ekildi.

Transdüksiyon yapılmış hücreler ertesi gün santrifüj edilerek (1000 rpm, 10 dakika), virüs içeren besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra pellet taze RPMI 1640 besiyeri ile yıkandı ve sonrasında temiz bir T-25 flaska ekilerek kültüre devam edildi (%5 CO₂, 37°C).

8.3. GFP^{pozitif} Hücrelerin FACS ile Ayırıştırılması

Transdüksiyonun sonunda hücre içerisine giren viral plazmidler, yapılarındaki LTR (Long Terminal Repeat) dizileri sayesinde hücre genomuna entegre olarak bölünme sonrasında yavru hücrelere aktarılırlar. Bu sayede aktarılan gen ürününü ve GFP'yi kalıcı olarak ifade eden GFP^{pozitif} hücreler akım sitometrisi (FACS, Fluorescence Associated Cell Sorting) kullanılarak izole edildi.

Kültürde çoğaltılan hücreler santrifüj edildikten sonra sort solüsyonu (%2 BSA, 4mM EDTA içeren PBS) içerisinde süspanse edildi (yaklaşık 2×10^6 hücre/ml) ve 40 µm hücre süzgecinden (cell strainer) geçirildi. GFP^{pozitif} hücreler FacsJazz (BD) akım sitometri cihazı ile ayırıştırılarak dondurulmuş FBS içeren tüpe toplandı. Ayrımdan sonra hücrelerin saflığı (GFP^{pozitif} hücre %'si) kontrol edildi. Santrifüj edilerek çöktürülen hücreler besiyeri ile yıkandıktan sonra uygun yoğunlukta ekilerek kültüre alındı.

8.4. RT-qPCR

8.4.1. Total RNA İzolasyonu

FACS ile ayırıştırılan ve kültürde çoğaltılan hücrelerden 2×10^6 canlı hücre 1000 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Hücre pelleti PBS ile yıkandıktan sonra, 1 ml TriPure izolasyon solüsyonunda iyice süspanse edildi. Kloroform (0,2 ml) eklenerek homojenize edilen örnekler oda sıcaklığında 2-3 dakika inkübe edildikten sonra 12000 xg'de 15 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ayrılan 3 fazdan en üstte kalan şeffaf RNA fazı pipet ile çekilerek temiz bir ependorfa aktarıldı ve her tüpe %100 izopropanol (0,5 ml) eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Santrifüjün (12000 xg'de 10 dakika +4°C) ardından ependorfun dibinde jelimsi bir pellet olarak kalan RNA 2 kere %75 etanol ile yıkanarak 14000 rpm'de 5 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Etanolün iyice uzaklaştırılması için oda sıcaklığında yaklaşık 10 dakika kurutulan RNA pelleti 30 µl RNaz içermeyen saf su ile süspanse edildi. İzole edilen RNA örneklerinin spektrofotometrik analizi ve miktar tayini Nanodrop ile yapıldıktan sonra RNA bandlarının bütünlüğü agaroz jel elektroforezi (%0,8) ile analiz edildi.

8.4.2. cDNA Sentezi (Ters Transkripsiyon)

İzole edilen total RNA örneklerinin içerisinde bulunan mRNA’lardan ters transkripsiyon reaksiyonu ile cDNA sentezi yapıldı. Üretici firma tarafından önerilen protokol takip edilerek her bir örnek için Tablo 8.2’de belirtilen reaksiyon karışımları hazırlandı.

Tablo 8.2: cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı.

Kimyasal	Miktar (1 reaksiyon için)
10X RT Buffer	2 µl
dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10X RT Random Primers	2 µl
Reverse Transcriptase (50 U/µl)	1 µl
RNase Inhibitor (20 U/µl)	1 µl
RNase-free dH ₂ O	3,2 µl
RNA Template (1 µg/10 µl)	10 µl
TOTAL	20 µl

Reaksiyon karışımları buz üzerinde hazırlandıktan sonra Tablo 8.3’te belirtilen termal PCR koşulları kullanılarak ters transkripsiyon reaksiyonu (cDNA sentezi) gerçekleştirildi.

Tablo 8.3: cDNA sentezi için kullanılan termal PCR şartları.

Sıcaklık	Süre
25°C	10 dakika
37°C	2 saat
85°C	5 dakika
4°C	∞

8.4.3. Eş Zamanlı Kantitatif PCR (qPCR)

Hücrelerdeki *DEK* ve *CD138* gen ekspresyon seviyelerini belirlemek amacıyla Tablo 8.3’te belirtilen reaksiyon karışımları hazırlandı ve Tablo 8.4’teki termal koşullar kullanılarak eş zamanlı kantitatif PCR (Real-Time Q-PCR) yapıldı.

Tablo 8.4: Eş zamanlı kantitatif PCR için kullanılan reaksiyon karışımı.

Kimyasal	Miktar (1 reaksiyon için)
2X Taqman Gene Expression Master Mix	10 µl
Taqman Gene Expression Assay (<i>DEK/CD138/ACTB</i> Taqman Probe)	1 µl
RNase-free dH ₂ O	2 µl
cDNA Template	1 µl
TOTAL	20 µl

Gen ekspresyon analizi için her bir örnek üç tekrarlı (replika) çalışıldı. Q-PCR cihazı (Applied Biosystems) tarafından belirlenen *DEK*, *CD138* ve referans gen olarak seçilen β -*ACTIN* (*ACTB*)’e ait Ct değerleri kullanılarak, her bir örneğe ait replikaların aritmetik ortalamaları alındı. Hesaplamalarda $\Delta\Delta Ct$ metodu kullanılarak her bir örnek için; *DEK*’e veya *CD138*’e ait ortalama Ct değerinden, *ACTB*’e ait ortalama Ct değeri çıkarılarak o örneğe ait ΔCt değeri hesaplandı. Elde edilen ΔCt değerlerinden, kontrol grubu olarak belirlenen (sh-Negatif veya MIG) örneklerin ΔCt değerleri çıkarıldı ($\Delta\Delta Ct$) ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılarak örneklerle ait *DEK* ve *CD138* mRNA seviyeleri göreceli olarak belirlendi. Sonuç olarak, *DEK* geni susturulan RPMI-8226 ve aşırı ifade ettirilen RPMI-8226/U266 hücrelerinde, gen ekspresyon düzeylerindeki değişim “kat artış” veya “kat azalış” şeklinde hesaplanmıştır.

Tablo 8.5: Eş zamanlı kantitatif PCR için kullanılan termal koşullar.

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
50°C	2 dakika	1
95°C	10 saat	1
95°C	15 saniye	40
60°C	1 dakika	

8.5. Western Blot Yöntemi ile Protein Analizi

8.5.1. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini

Protein izolasyonu için yaklaşık 2×10^6 canlı hücre 1000 rpm’de 10 dakika $+4^{\circ}\text{C}$ ’de santrifüj edilerek çöktürüldükten sonra pellet 10 ml soğuk PBS ile yıkandı ve tekrar santrifüj edildi. Üst sıvı iyice uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 100 μl tamamlanmış RIPA tamponunda (99 μl RIPA + 1 μl Proteaz/Fosfataz inhibitörü) süspanse edilerek liziz yapıldı. Liziz süresince örnekler, 10 dakikada bir vortekslenerek ve pipetaj yapılarak 30 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Örnekler 13000 rpm’de 15 dakika $+4^{\circ}\text{C}$ ’de santrifüj edildikten sonra protein içeren üst sıvı pipet yardımıyla çekilerek temiz bir ependorfa alındı.

Tablo 8.6: RIPA tamponu içeriği.

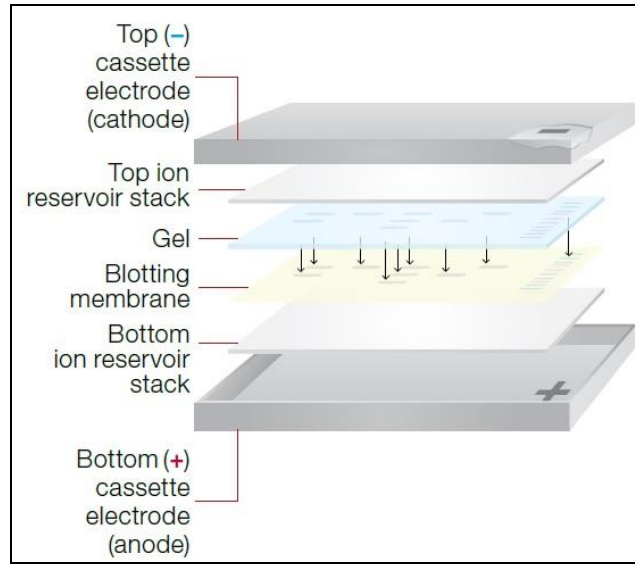
Kimyasal	Miktar
Sodyum Klorür (NaCl)	150 mM
Sodyum Deoksikolat	%0,5 (v/v)
NP40	%1 (v/v)
SDS	%0,1 (v/v)
Tris-HCl (pH=8.0)	50 mM

İzolasyonun ardından Pierce BCA Protein Assay kiti kullanılarak protein miktar tayini yapıldı. Firma tarafından belirlenen protokole göre kit içerisindeki A ve B solüsyonları 50:1 oranında karıştırılarak çalışma solüsyonu hazırlandıktan sonra her bir kuyuya (96-well) 200 μl dağıtıldı. Çalışma solüsyonu dağıtılan kuyucuklara miktar tayini yapılacak örneklerden veya miktarı bilinen protein standartlarından (albümin) 25 μl eklendi. Örnekler karanlıkta 30 dakika (37°C ’de) inkübe edildikten sonra plaka okuyucu spektrofotometrede 562 nm dalga boyunda ölçüm alındı. İki replikalı çalışılan örnekler için A_{562} değerlerinin ortalamaları alındıktan sonra standart grafik hazırlandı. Belirlenen eğri formülünde miktarı bilinmeyen protein örneklerine ait A_{562} değerleri ilgili yerlere yazılarak protein konsantrasyonları hesaplandı.

8.5.2. SDS-PAGE ve Western Blot

Konsantrasyonu belirlenen örneklerden 30 µg total protein hesaplanarak 4X yükleme tamponu (900 µl Laemmli SDS Tamponu + 100 µl β-ME) ile 1:3 (v/v) oranında karıştırıldı. Denatürasyon için 95°C’de 5 dakika kaynatılan örnekler, moleküler ağırlık tespiti için kullanılan protein marker ile birlikte %10’luk hazır denatüre edici poliakrilamid jele (SDS-PAGE) yüklenerek yürütüldü (100 V, ~1,5 saat).

Moleküler ağırlığına göre ayrılan proteinler Bio-Rad TransBlot® Transfer sistemi kullanılarak nitroselüloz membrana aktarıldı. Transfer kaseti Şekil 8.1’de gösterildiği şekilde hazırlanarak cihaza yerleştirildi ve Mixed MW programı (1,3 A, 25 V) kullanılarak membrana transfer yapıldı [Web 3, 2018].



Şekil 8.1: Bio-Rad transfer kasetinin hazırlanması.

Transfer sonrası membran hazırlanan TBS-T (1X TBS içerisinde %0,5’lik Tween20) solüsyonu içerisinde 1 dakika kadar bekletilerek durulandıktan sonra bloklama solüsyonunda (TBS-T içerisinde %5’lik BSA) 1 saat inkübe edildi. Membran ilk olarak DEK’e özgün primer antikor ile muamele edildikten sonra TBS-T ile 3 kez 5’er dakika yıkandı ve sekonder antikor (anti-fare IgG) uygulandı. TBS-T yıkamasının (3x5 dakika) ardından hazırlanan 1 ml Pierce ECL Plus solüsyonu (Solüsyon A+Solüsyon B, 40:1) membran üzerine dökülerek ChemiDoc XRS+ (BioRad) görüntüleme sistemi ve Image Lab yazılımı ile protein bandları tespit

edildi. Görüntülemeyen sonra membran 5 dakika TBS-T’de çalkalanarak yıkandı. GAPDH primer antikoru uygulandıktan ve membran TBS-T ile yıkandıktan sonra sekonder antikor (anti-tavşan IgG) uygulandı. Membran tekrar yıkandıktan sonra aynı şekilde görüntü alındı. Protein bandlarının tespit edilmesinde kullanılan antikorlar ve sulandırım oranları Tablo 8.6’da ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 8.7: Western Blot’ta kullanılan antikor sulandırım oranları, inkübasyon sıcaklıkları ve süreleri.

	Sulandırım Oranı	Sıcaklık	Süre
Fare anti-insan DEK antikoru	1:1000	+4°C	Gece boyu
Anti-fare IgG (HRP konjuge) antikoru	1:5000	Oda sıcaklığı	1 saat
Tavşan anti-insan GAPDH antikoru	1:3000	+4°C	Gece boyu
Anti-tavşan IgG (HRP konjuge) antikoru	1:5000	Oda sıcaklığı	1 saat

8.6. Proliferasyon Analizi

Hücreler, her bir kuyucukta 2×10^5 canlı hücre/ml olacak şekilde toplam 3 ml büyüme besiyeri içerisinde 6-kuyucuklu plakalara ekildi (her örnek için duplike olarak ekim yapılmıştır). Hücrelerin ekilmesini takip eden her 24 saatte bir Countess (Invitrogen) hücre sayım cihazı ile sayım yapıldı. Sayım yapılacak kuyuda hücrelerin homojen bir şekilde dağılması için kısaca pipetaj yapıldı ve 10 µl hücre numunesi alınarak 10 µl trypan mavisi ile karıştırıldı. Sayıları ve canlılık oranları belirlenen hücrelerin 5 gün boyunca kültürüne devam edilerek aynı şekilde sayım yapıldı. Her gün için belirlenen toplam hücre sayıları ekim anındaki (0. Gün) toplam hücre sayılarına bölünerek normalizasyon yapıldı. Dolayısıyla DEK gen ifadesi susturulan veya aşırı ifade ettirilen RPMI-8226 ve U266 hücreleri ile kontrol gruplarının çoğalma kapasitelerindeki zamana göre değişim, birbirinden bağımsız 4 deneyin ortalaması alınarak “kat farkı” olarak grafiğe yansıtıldı. Bununla birlikte hücre bölünmelerinin logaritmik fazda olduğu ilk 4 güne ait toplam hücre sayıları kullanılarak hücrelerin bölünme süreleri (doubling time) hesaplandı [Web 4, 2018].

8.7. Melphalan Toksisitesi Analizi

DEK ekspresyonu modifiye edilmiş RPMI-8226 ve U266 hücreleri literatürde bu hücreler için belirlenmiş olan 10 μ M ve 20 μ M melphalan [Chen et al., 2005], [Xie et al., 2014] veya asit-alkol (melphalan'ın çözülmesi için kullanılan "vehicle" kontrol) varlığında proliferasyon analizinde kullanılan koşullarda (ekilen hücre sayısı, ekim hacmi vb.) kültür edildi. Belirlenen zaman aralıklarında (0, 48, 72 saat) Countess hücre sayım cihazı ile hücre sayıları (canlı, ölü, toplam) ve % canlılık oranları (canlı hücre sayısı/toplam hücre sayısı x100) hesaplandı. Her hücre grubunun ilgili saatteki hücre canlılığı oranı (%), başlangıçtaki (0.saat) hücre canlılığı oranına bölünerek elde edilen "normalize edilmiş hücre canlılık" oranları kullanılarak hücre büyüme grafikleri oluşturuldu.

8.8. Hücre Döngüsü Analizi

Melphalan sitotoksosite analiziyle eş zamanlı olarak akım sitometrisi ile hücre döngüsü analizi yapıldı. Sitotoksosite deneyinin 48. ve 72. saatlerinde hücre sayımının ardından aynı deney grubuna ait replikalar homojen bir şekilde karıştırılarak 1×10^6 hücre falkona aktarıldı ve santrifüj (1000 rpm 10 dakika +4°C) ile çöktürüldü. Yaklaşık 10 ml soğuk PBS ile yıkanan hücreler, fiksasyon için buz üzerinde %70 (v/v) etanol ile 30 dk. inkübe edildi. Etanolün iyice uzaklaştırılmasının ardından PBS ile yıkanan örneklerin üzerine, 500 μ l Propodium Iodide (PI) boyama solüsyonu (PBS içerisinde 20 μ g/ml PI, %0,1 (v/v) Triton X-100 ve taze olarak 10 μ g/ml RNaz eklenmiştir) eklenerek oda sıcaklığında (karanlıkta) 30 dk. inkübe edildi. Son olarak santrifüj edilerek boyama solüsyonu uzaklaştırılan ve yıkanan örnekler, PBS içerisinde süspanse edilerek BD Influx akım sitometri cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. Hücre döngüsü fazlarının (Sub G1, G0/G1, S ve G2/M) ayırt edilebilmesi için hücrelerdeki DNA miktarını gösteren PI floresan şiddeti/hücre sayısı histogram grafiği kullanıldı.

8.9. Giemsa Boyama

Giemsa boyama, hücre çekirdeği (pembe-mor) ve sitoplazmayı (mavi-mor) farklı renklerde boyamak için sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Kültürden alınan hücreler sitosantrifüj (Thermo Cytospin 4) kullanılarak lamlara çöktürüldü (1000 rpm, 5 dakika, ACC:1). Oda sıcaklığında kurutulan (1 saat) preparatlar, 10 dakika metanol ile fikse edildi. Giemsa boyama solüsyonu (1:20 oranında seyreltik) ile 20 dk. inkübe edilen örnekler su ve etanol ile yıkandıktan sonra 1-2 dakika ksilol ile muamele edildi. İyice kurutulan preparatlar, üzerine lamel kapatıldıktan sonra ışık mikroskobu ile incelendi.

8.10. İmmünohistokimyasal (ICC) Yöntem ile CD138 Tespiti

ICC boyama için yaklaşık 5×10^4 canlı hücre 1000 rpm'de 5 dakika, sitosantrifüj (Thermo Cytospin4) ile lama yapıştırıldıktan sonra kurumadan %10 formalinde (oda sıcaklığında 10 dk.) inkübe edildi. İkişer kez (5 dk.) ultra saf su ve TBS ile yıkanan lamlar hidrofobik kalem ile çizildi. Her alana Van Gogh solüsyonunda 1:100 oranında sulandırılmış 100 µl CD138 antikoru (Biocare #CM167B) damlatılarak nemli ortamda 1 saat (oda sıcaklığında) inkübe edildi. Üç kez TBS (5 dk) ile yıkanan preparatlara ikişer damla alkalın fosfataz-konjüge sekonder antikor damlatıldı. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyonun ardından ultra saf su ve üç kez TBS (5 dk.) ile yıkanan lamlara, 100 µl sulandırılmış Warp Red Chromogen (32 µl WRC + 2,5 ml tampon) uygulanarak 2-3 dakika (mikroskop altında kırmızı boyama gerçekleşene kadar) bekletildikten sonra su ile durulandı. TBS ile yıkamanın ardından Gill's Hematoxylin solüsyonu ile muamele edilen (3 dk. kadar) lamlar (su ile durulandıktan sonra), %1 amonyum hidroksite daldırılarak 20-30 saniye bekletildi. Su ile durulandıktan sonra kurutulan preparatlara az miktarda kapatma maddesi damlatılarak lamel kapatıldı ve tırnak cilası ile yapıştırıldı.

8.11. İmmünfloresan (IF) Boyama

IF boyama için sitosantrifüj ile lama yapıştırılan hücreler (ICC ile aynı parametreler kullanılmıştır) oda sıcaklığında 15 dakika %10 formalinde fikse edildi.

Hidrofobik kalemle örnek alanları çizildikten sonra 3 kez PBS ile (5'er dk.) yıkama yapıldı. Örnekler, PBS ile sulandırılmış yağsız süt tozu (%2, w/v) ile oda sıcaklığında 20 dakika bloklandıktan sonra %1 (w/v)'lik süt tozunda 1:400 oranında sulandırılan 100 µl CD138 antikoru ile 1 saat inkübe edildi. PBS ile sulandırılmış yağsız süt tozu (%1, w/v) ile 3 kez (5 dk.) yıkandıktan sonra, her bir alana 100 µl Alexa555-konjüge sekonder antikor (1:400 sulandırılmış) uygulandı (oda sıcaklığında 1 saat). Ultra saf su ile 6 kez durulanan lamalar kurutulduktan sonra DAPI içeren kapatma maddesi uygulanarak lamel ile kapatıldı ve tırnak cilası ile yapıştırıldı.

8.12. Akım Sitometrisi ile CD138 Analizi

Aynı hücre grubundan 1×10^6 canlı hücre iki ayrı tüpte santrifüj (1000 rpm, 10 dk, +4°C) edilerek çöktürüldü. Pelletlerden birisinin üzerine 200 µl soğuk tampon (steril PBS içerisinde %5 FBS, v/v) içerisinde 20 µl CD138-PE antikoru (BD, 347206), negatif (boyasız) kontrol olarak kullanılacak tüpe ise 220 µl soğuk tampon eklendikten sonra örnekler kısaca vortekslendi. Buz üzerinde 30 dakika (karanlıkta) inkübe edilen örneklerin üzerine 1 ml soğuk tampon eklenerek santrifüj edildi. Tekrar 1 ml soğuk tampon ile yıkanıp santrifüj edilen pellet, 100 µl tamponda süspanse edildi. Ardından 3 µl DAPI ile 5 dakika (buz üzerinde ve karanlıkta) boyanan örnekler BD Influx akım sitometrisi cihazından (Medipol Üniversitesi, REMER) geçirildi. Elde edilen sonuçların analizi FlowJo (FlowJo, LLC) hücre analiz yazılımı ile yapıldı.

8.13. Hücre Adezyon Deneyi

Öncelikle adezyon deneyinde kullanılacak olan 96-kuyucuklu plakaların (TPP) yüzeyi fibronektin ile kaplandı. Bunun için her bir kuyuya, hazırlanan 20 µg/ml fibronektin solüsyonundan 100 µl eklenerek 37°C'de 2 saat inkübe edildi. Sonrasında kuyucuklar steril PBS ile 2 kez yıkanarak hücre ekimine hazır hale getirildi.

Fibronektin kaplanmış kuyucuklara 200 µl besiyeri içerisinde 4×10^4 canlı hücre, üçer replika olacak şekilde ekilerek 16 saat nemlendirilmiş inkübatörde (37°C, %5 CO₂) kültürlendi. Ardından kuyucuklar 2 kez 100 µl PBS ile yıkanarak (plaka orta sertlikte alt-üst edildi) yüzeye tutunmayan hücreler kuyudan uzaklaştırıldı.

Kuyulara 100 µl besiyeri ve 10 µl WST-1 hücre canlılık boyası eklenerek 37°C’de 4 saat inkübe edildikten sonra plaka okuyucu spektrofotometre ile 450 nm dalga boyunda ölçüm alındı. Aynı şekilde hazırlanan bir başka 96-kuyucuklu plakaya deney grubuyla aynı sayıda hücre ekildi. Referans (kontrol) grubu olarak kullanılan bu plaka yıkama (tutunmayan hücrlerin uzaklaştırılması) aşamasına tabi tutulmadan doğrudan WST-1 ile inkübe edildi ve sayede başlangıçta ekim yapılan canlı hücre miktarı tespit edildi. Absorbans değerlerinden blank (sadece besiyeri) çıkarma işlemi yapıldıktan sonra replikaların ortalaması alındı. Her bir hücre grubuna ait hesaplanan değerler kontrol plakasından okunan değerlere bölündükten sonra 100 ile çarpılarak başlangıçta ekilen hücre sayısına göre “% Adezyon Oranı” hesaplandı.

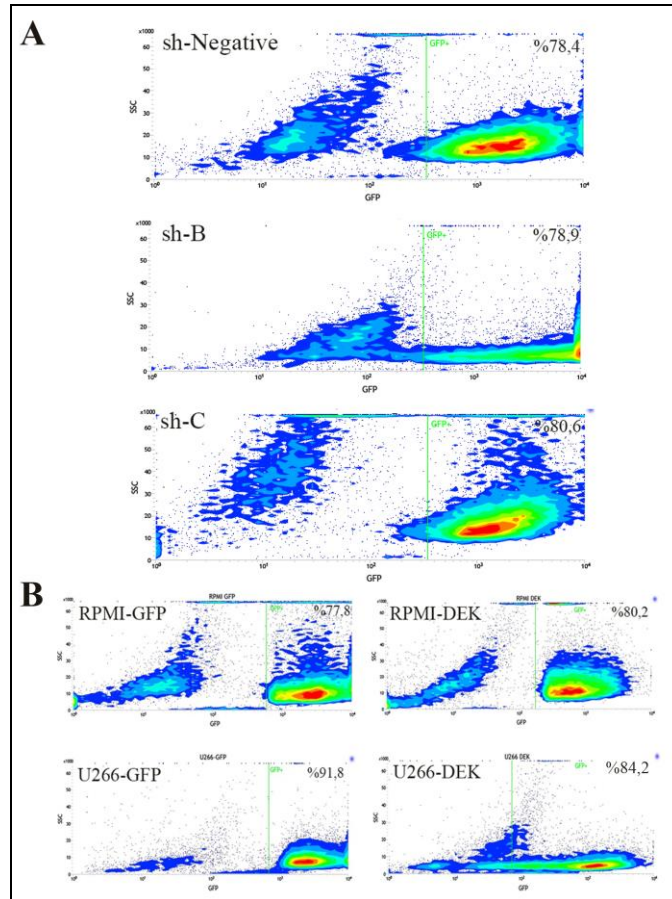
8.14. Verilerin İstatistiksel Analizi

Deneyisel çalışmalardan elde edilen verilerin istatistiksel analizi ve grafik çizimleri GraphPad Prism 6 yazılımı kullanılarak yapıldı. Birbirinden bağımsız deneylerden elde edilen verilerin istatistiksel anlamlılığı, deney tasarımına (replika sayısı, grup sayısı vb.) uygun olan veri değerlendirme ölçütü (Student’s t-test, ANOVA testi vb.) seçilerek kontrol edildi.

9. BULGULAR

9.1. MM Hücre Hatlarında DEK İfadesinin Manipülasyonu

Viral transdüksiyonun ardından DEK ifadesi baskılanan RPMI-8226 ve DEK'i aşırı ifade eden RPMI-8226 ile U266 hücre hatları açıklanan kültür koşullarında çoğaltıldı. GFP^{pozitif} hücre oranları belirlendikten ve gerekli sort ayarları yapıldıktan sonra aktarılan vektörleri kalıcı olarak ifade eden MM hücreleri FACS (BD FacsJazz) ile ayrıştırıldı. Ayrıştırılan GFP^{pozitif} hücreler kültürde çoğaltıldıktan sonra akım sitometrisi ile GFP oranları kontrol edildiğinde, hücre ayrıştırmasının başarılı bir şekilde gerçekleştiği ve GFP^{pozitif} hücrelerin yüksek saflıkta olduğu görüldü (Şekil 9.1).



Şekil 9.1: FACS ile ayrıştırılarak kültürlerine devam edilen hücre hatlarının GFP^{pozitif} hücre oranlarının belirlenmesi. Üstteki üç panel shRNA ile transdüksiyon sonrasında; alttaki dört panelse aşırı DEK ekspresyonu sağlamak amacıyla uygulanan retroviral transdüksiyon sonrasında FACS'la ayrıştırılmış hücrelerdeki GFP oranlarını göstermektedir.

Tablo 9.1: FACS ile elde edilen RPMI-8226 ve U266 hücre popülasyonları.

RPMI-8226	U266	Açıklama	Kısaltma
MSCV-IRES-GFP	MSCV-IRES-GFP	Negatif kontrol	MIG
MSCV-DEK-IRES-GFP	MSCV-DEK-IRES-GFP	DEK'in aşırı ekspresyonu	MIG-DEK
pGFP-V-RS	---	Negatif kontrol	sh-Negative
pGFP-V-RS sh-RNA B	---	Endojen DEK ifadesinin susturulması	shDEK-B
pGFP-V-RS sh-RNA C	---		shDEK-C

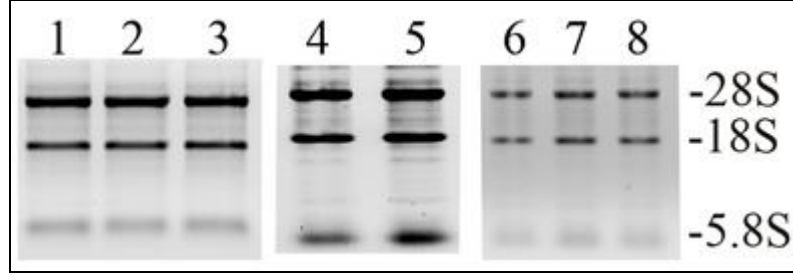
9.2. DEK Ekspresyonunun Doğrulanması

9.2.1. mRNA Seviyesinde Doğrulama

FACS ile ayrıştırılan hücrelerden izole edilen total RNA'nın saflığı ve bütünlüğü kontrol edildi. Yapılan spektrofotometrik analiz, hücrelerden izole edilen RNA örneklerinin saflıklarının, konsantrasyonlarının (Tablo 9.2) ve bütünlüklerinin (Şekil 9.2) RT-qPCR için uygun ve yüksek kalitede olduğunu göstermiştir.

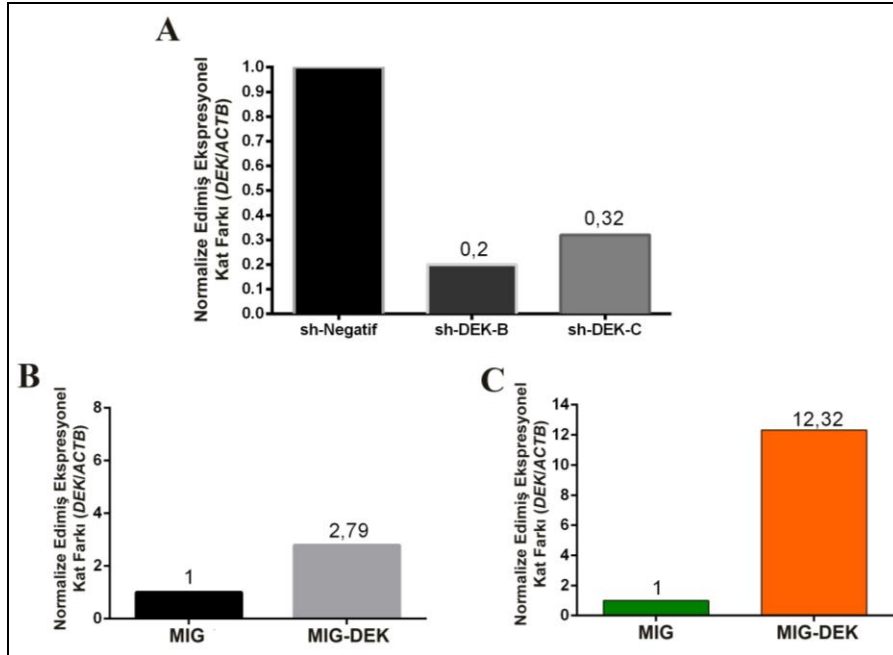
Tablo 9.2: İzole edilen RNA örneklerinin spektrofotometrik analizi.

	Konsantrasyon (ng/μl)	OD _{260/280}	OD _{260/230}
sh-Negative	15,25	1,79	0,47
shDEK-B	1039,21	2,01	2,32
shDEK-C	959,67	2,00	2,19
RPMI MIG	556,27	1,95	2,28
RPMI MIG-DEK	531,30	1,95	2,25
U266 MIG	112,37	1,89	1,28
U266 MIG-DEK	151,74	1,90	1,80



Şekil 9.2: Total RNA örneklerine ait agaroz jel görüntüsü (1: shDEK-B, 2: shDEK-C, 3: shDEK-D, 4: RPMI MIG, 5: RPMI MIG-DEK, 6: U266, 7: U266 MIG, 8: U266 MIG-DEK).

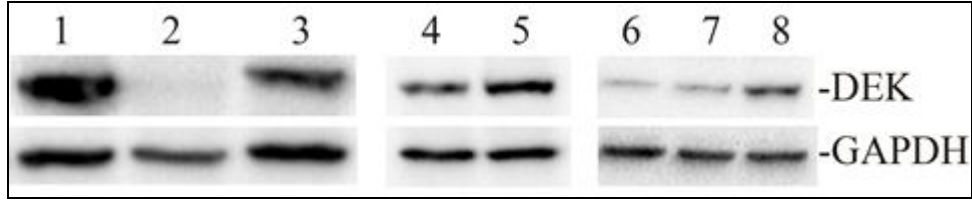
Total RNA örneklerinden ters transkripsiyon (Reverse transcription “RT”) ile cDNA sentezi yapıldıktan sonra viral transdüksiyon yapılmış hücrelerde *DEK* ekspresyon seviyesi kantitatif PCR (RT-qPCR) kullanılarak mRNA düzeyinde analiz edildi. Bu sayede knock-down yapılan RPMI-8226 hücrelerinde *DEK* ifadesinin mRNA düzeyinde baskılandığı (Şekil 9.3A); *DEK*’i aşırı ifade etmesi amaçlanan RPMI-8226 ve U266 hücrelerinde ise *DEK*’in aşırı ifade edildiği doğrulanmıştır (Şekil 9.3B, 9.3C). *DEK* ekspresyonu susturulan RPMI-8226 hücrelerinden, sh-DEK-B ve sh-DEK-C vektörlerinin aktarıldığı hücrelerdeki baskılanmanın yeterli olduğu görüldü (Şekil 9.3A) ve bu iki hücre grubu kullanılarak planlanan deneylere devam edildi.



Şekil 9.3: RPMI-8226 hücrelerinde *DEK* ifadesindeki baskılanmanın (A) ve RPMI-8226 hücreleri (B) ile U266 hücrelerinde (C) aşırı *DEK* ifadesinin mRNA düzeyinde RT-qPCR yöntemiyle doğrulanması.

9.2.2. Protein Düzeyinde Doğrulama

RT-qPCR analizinin ardından, FACS ile ayrıştırılan hücrelerden protein izole edilerek Western blot yapıldı. Örneklere ait protein bandları karşılaştırıldığında; yükleme kontrolü olarak kullanılan GAPDH bandı beklendiği üzere benzer yoğunlukta iken, sh-DEK-B ve sh-DEK-C hücrelerine ait DEK bandlarında sh-Negatif'e göre azalma olduğu tespit edildi (Şekil 9.4). Bununla birlikte, aşırı ekspresyon yapılan RPMI-8226 ve U266 hücrelerine ait protein bandları karşılaştırıldığında, MIG-DEK gruplarına ait bandların RPMI/U266 MIG kontrol hücrelerine ait bandlara göre daha yoğun olduğu görüldü (Şekil 9.4). Western blot analiziyle tespit edilen DEK protein seviyesindeki baskılanmanın veya artışın RT-qPCR sonucu hesaplanan göreceli mRNA seviyeleriyle (Şekil 9.3) paralel olduğu görüldü.



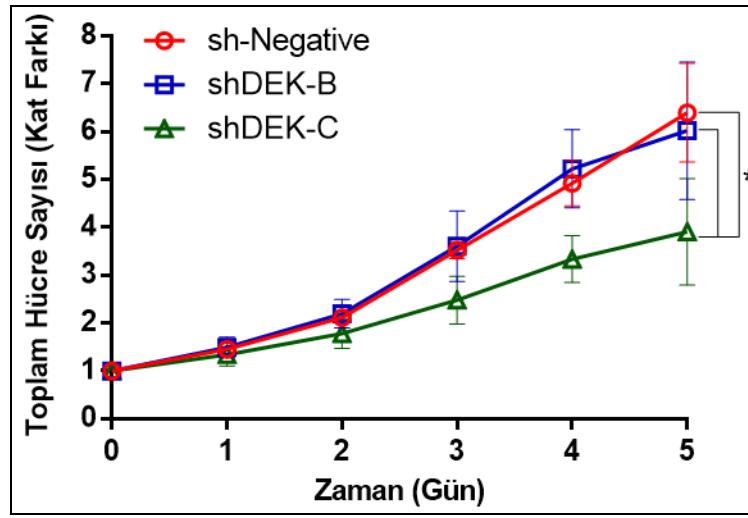
Şekil 9.4: Knock-down yapılan RPMI-8226 hücreleri ile aşırı DEK ifadesi yapılan RPMI-8226 ve U266 hücrelerinde DEK ifadesindeki baskılanmanın ve aşırı ifadenin protein düzeyinde doğrulanması (1: sh-Negatif, 2: sh-DEK-B, 3: sh-DEK-C, 4: RPMI MIG, 5: RPMI MIG-DEK, 6: U266, 7: U266 MIG, 8: U266 MIG-DEK).

Viral transdüsiyon ve FACS ile ayrıştırmanın ardından yapılan RT-qPCR (Şekil 9.3) ve Western blot (Şekil 9.4) analiz sonuçları ile shRNA aktarılan RPMI-8226 hücrelerinde endojen DEK ifadesinin kalıcı olarak baskılandığı; ektopik DEK cDNA'sı aktarılan RPMI-8226 ve U266 hücre hatlarındaysa kalıcı olarak DEK'in aşırı ifade edildiği (overexpression) RNA ve protein düzeyinde doğrulanmıştır.

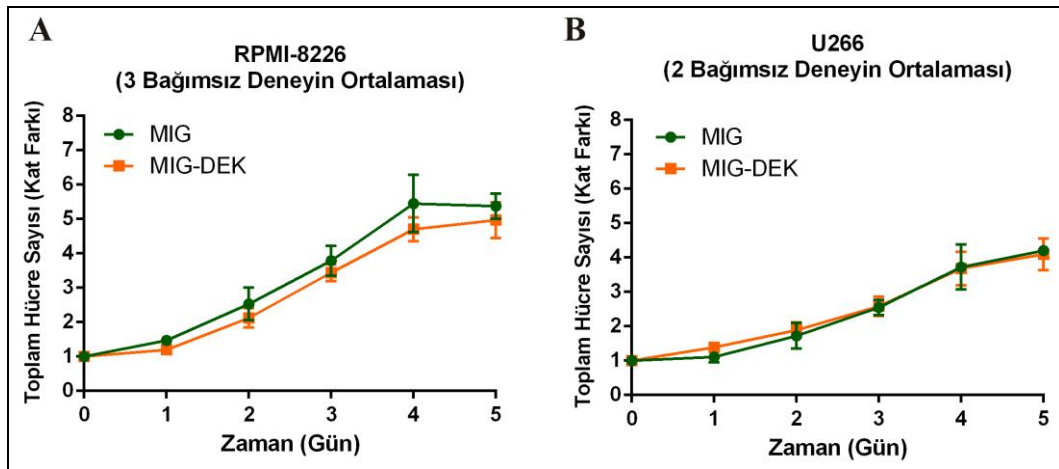
9.3. DEK İfadesi Modifiye Edilen MM Hücre Hatlarının Çoğalma Kapasitesi ve Bölünme Sürelerinin Belirlenmesi

DEK gen ifadesindeki kalıcı değişimlerin (baskılama veya aşırı ifade) RPMI-8226 ve U266 hücre hatlarının proliferatif özellikleri üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla proliferasyon analizi yapıldı. Kontrol grubu (sh-Negative) ile

karşılaştırıldığında, shDEK-B hücrelerinin büyüme eğrisinin 5 gün boyunca benzer şekilde seyrettiği, shDEK-C hücrelerinin çoğalmalarında ise sadece 5. günde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür. shDEK-C’de meydana gelen bu değişimin sh-Negative hücrelerine oranla yaklaşık 1,6 kat ile sınırlı kaldığı ve shDEK-B hücrelerinin çoğalmalarında bir fark görülmediği düşünüldüğünde, DEK gen ifadesindeki baskılanmanın RPMI-8226 hücrelerinin çoğalmaları üzerinde etkisi olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 9.5).DEK’in her iki hücre hattında aşırı ifadesinin kontrol hücrelerine göre büyüme eğrilerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı görülmüştür (Şekil 9.6).

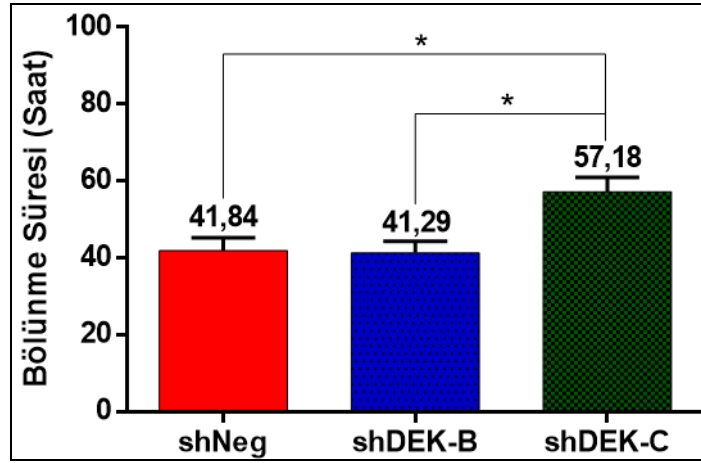


Şekil 9.5: Endojen DEK ifadesindeki baskılanmanın RPMI-8226 hücrelerinin büyüme eğrileri üzerindeki etkisi (Two-way ANOVA, *p<0,05).

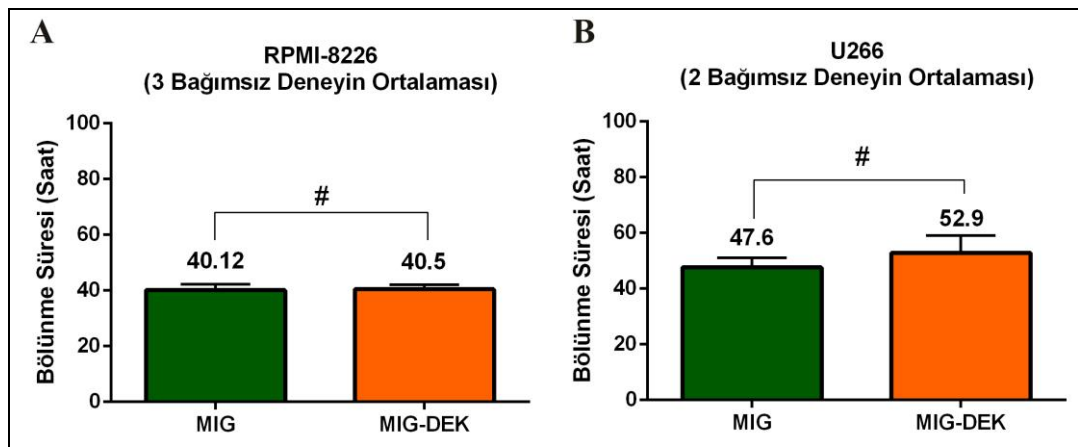


Şekil 9.6: Aşırı DEK ekspresyonunun RPMI-8226 (A) ve U266 (B) hücrelerinin büyüme eğrileri üzerindeki etkisi (Two-way ANOVA, ns; istatistiksel olarak anlamsız).

Hücre bölünmelerinin logaritmik fazda olduğu ilk 4 güne ait toplam hücre sayıları kullanılarak hücrelerin bölünme süreleri hesaplandı. Büyüme eğrileri ile tutarlı bir şekilde sh-Negative ve shDEK-B arasında bir fark olmadığı, shDEK-C bölünme süresinde, sh-Negative'e göre yaklaşık 15 saatlik istatistiksel olarak anlamlı bir uzama olduğu tespit edilmiştir (Şekil 9.7). shDEK-C hücrelerinin büyüme eğrisinde meydana gelen 1,6 katlık hafif düşüşe, bölünme süresinde meydana gelen bu 15 saatlik uzamanın neden olduğu görülmektedir. *DEK*'in ektopik ekspresyonunun U266 hücrelerinin bölünme sürelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte yaklaşık 5 saatlik bir uzamaya neden olmasına rağmen *DEK*'in aşırı ifadesinin RPMI-8226 hücrelerinin bölünme sürelerine bir etkisi olmadığı görülmüştür (Şekil 9.8).



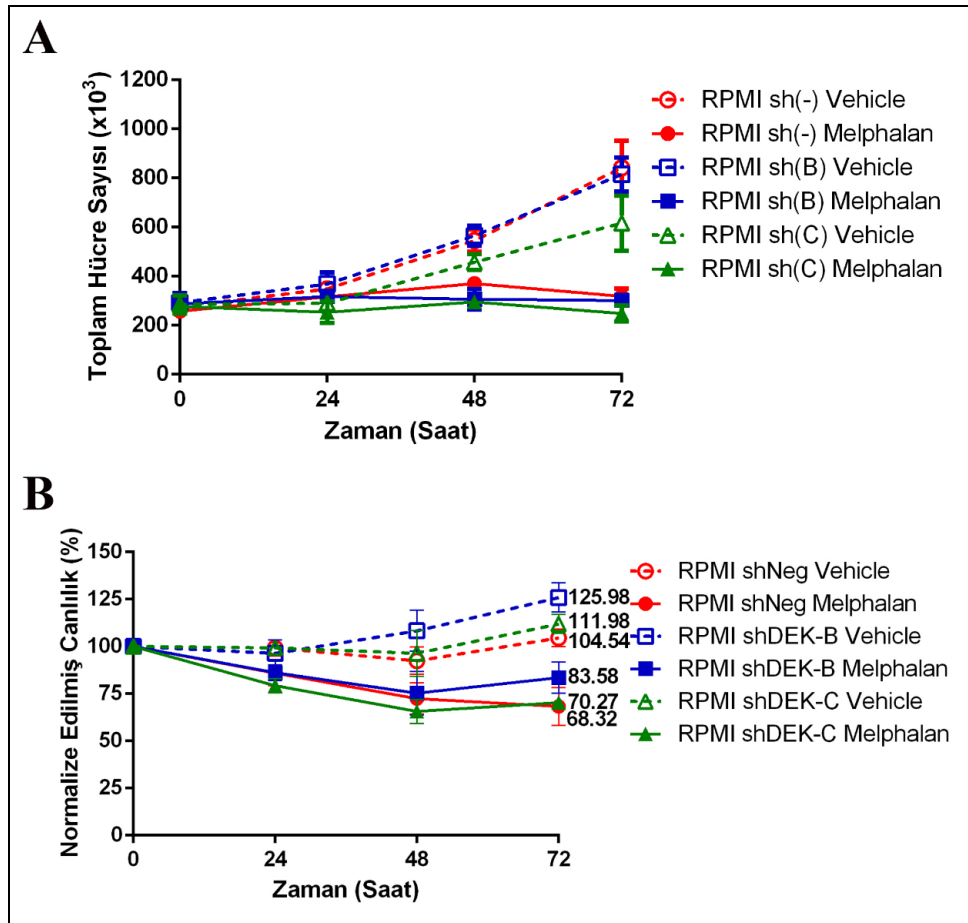
Şekil 9.7: Endojen DEK ifadesindeki baskılanmanın RPMI-8226 hücrelerinin bölünme süreleri üzerindeki etkisi (Unpaired t-test, * $p < 0,05$).



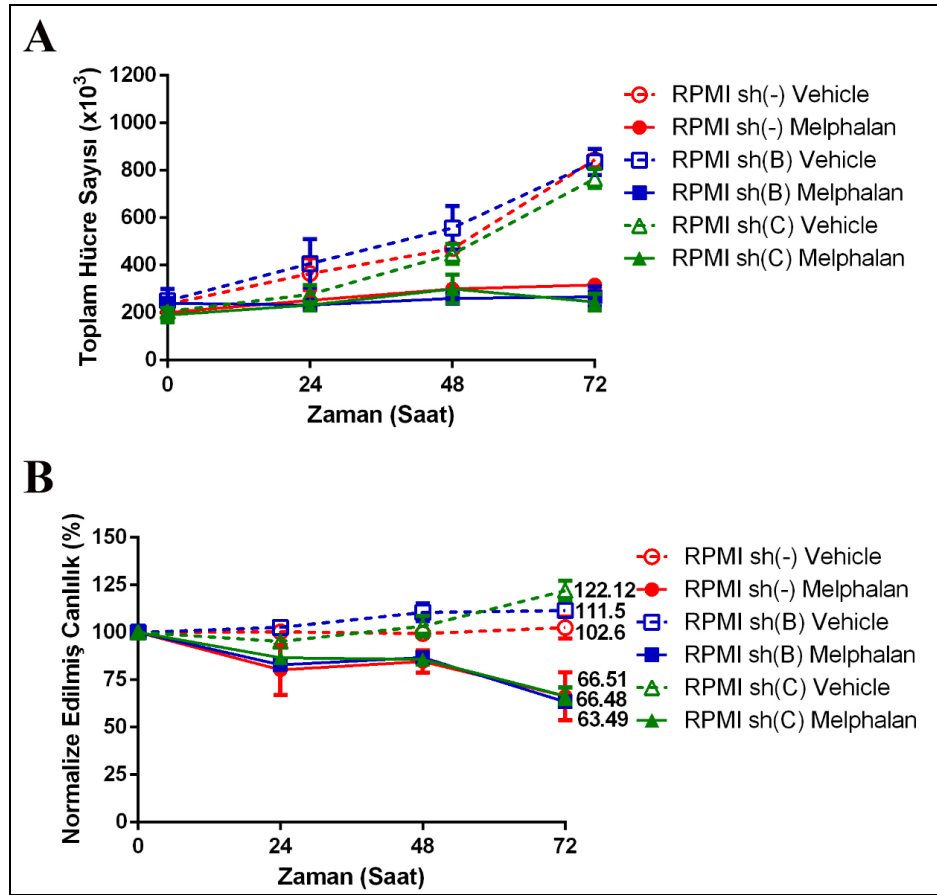
Şekil 9.8: Ektopik DEK ekspresyonunun RPMI-8226 (A) ve U266 (B) hücrelerinin bölünme süreleri üzerindeki etkisi (Unpaired t-test, # $P \geq 0,05$).

9.4. *DEK* İfadesi Modifiye Edilen MM Hücre Hatlarının Melphalan Hassasiyetinin Belirlenmesi

MM hastalarında kullanılan bir kemoterapi ilacı olan melphalanın RPMI-8226 ve U266 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin *DEK* gen ifadesindeki değişimlerden etkilenip etkilenmediği test edilmiştir. Farklı melphalan konsantrasyonlarında (10 μ M ve 20 μ M) 72 saat boyunca kültürlenmiş MM hücre hatlarının hücre sayıları ve canlılık oranları (%) hesaplandı. Besiyerinde ilaç içermeyen (vehicle) kontrol hücrelerinin sayılarının beklendiği üzere zamana bağlı olarak arttığı ve canlılık oranlarının azalmadığı tespit edildi (Şekil 9.9, Şekil 9.10). 10 μ M ve 20 μ M melphalan varlığında *DEK* ifadesi susturulmuş ve sh-Neg kontrol RPMI-8226 hücre sayılarının 72 saat boyunca benzer şekilde sabit kaldığı, canlılıklarının ise zamana bağlı olarak düştüğü görüldü (Şekil 9.9, Şekil 9.10).

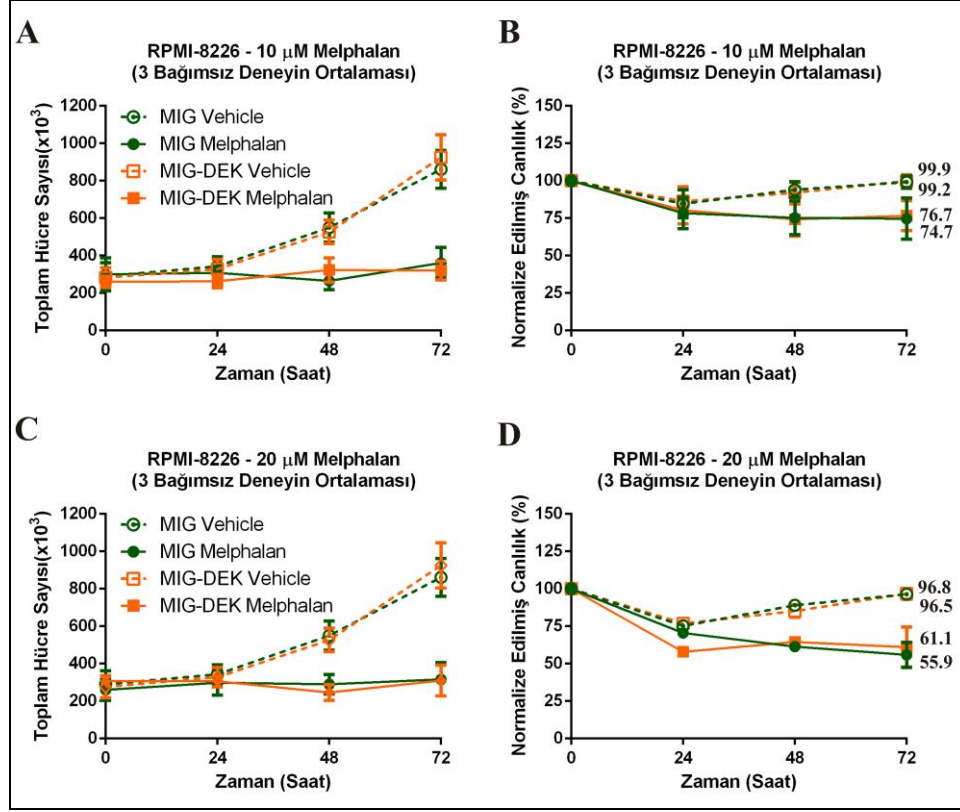


Şekil 9.9: 10 μ M melphalan ile muamele edilen *DEK* ifadesi susturulan ve kontrol RPMI-8226 hücrelerinin büyüme eğrileri (A) ve canlılıklarına (B) ait grafik (Birbirinden bağımsız 4 deneyin ortalamaları alınmıştır).

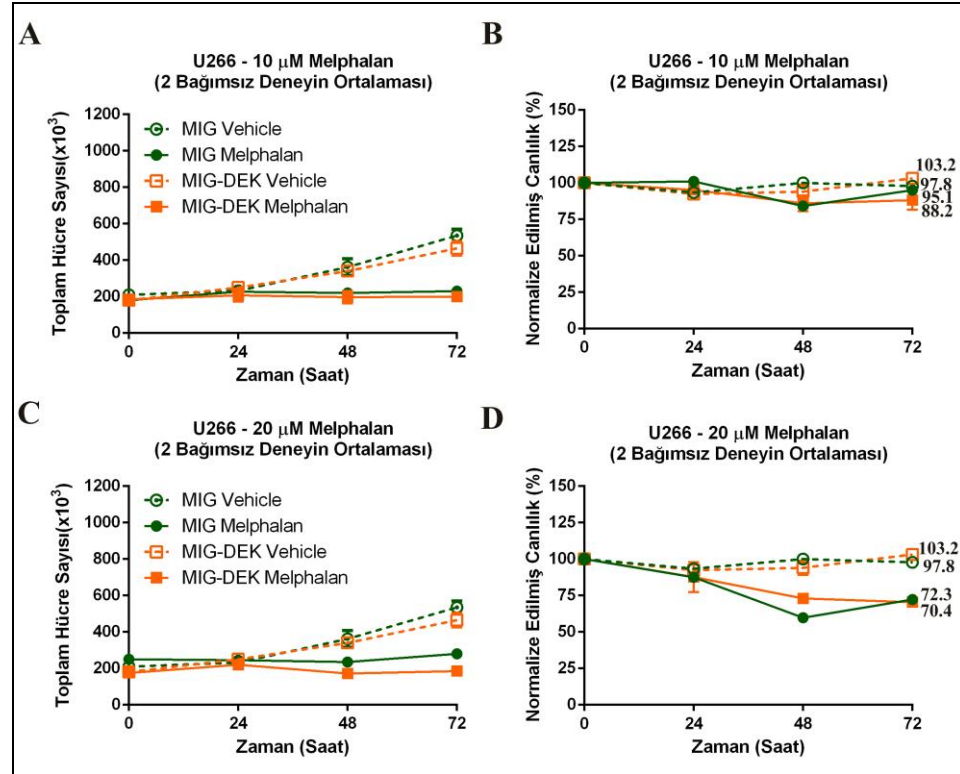


Şekil 9.10: 20 μ M melphalan ile muamele edilen DEK ifadesi susturulan ve kontrol RPMI-8226 hücrelerinin büyüme eğrileri (A) ve canlılıklarına (B) ait grafik (Birbirinden bağımsız 2 deneyin ortalamaları alınmıştır).

Benzer şekilde, kontrol gruplarında (vehicle) hücre sayılarındaki beklenen artış ve sabit kalan canlılık oranlarına rağmen, MIG kontrol hücreleri ile DEK'i aşırı ifade eden RPMI-8226 (Şekil 9.11) ve U266 hücrelerinin (Şekil 9.12) 10 μ M ve 20 μ M melphalan ile muamelesi sonucu hücre sayılarının ve canlılıklarının 72 saat boyunca sabit kaldığı ve bu sonucun biyolojik ve istatistiksel olarak anlamlı derecede fark göstermediği tespit edildi.



Şekil 9.11: 10 µM ve 20 µM Melphalan ile muamele edilen RPMI-8226 hücrelerine ait büyüme eğrileri (A, C) ve % canlılık oranları (B, D).



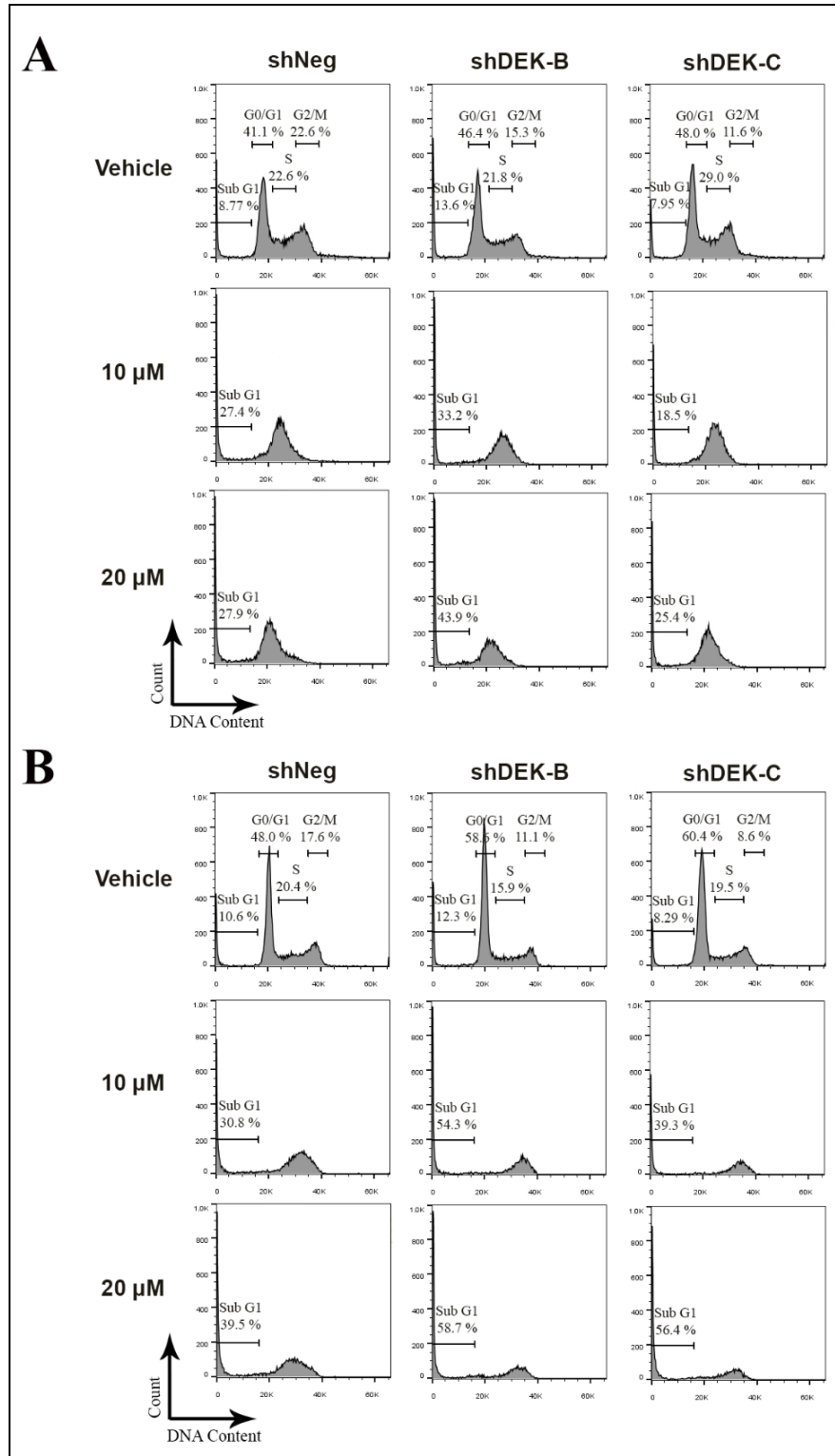
Şekil 9.12: 10 µM ve 20 µM Melphalan ile muamele edilen U266 hücrelerine ait büyüme eğrileri (A, C) ve % canlılık oranları (B, D).

Elde edilen veriler birlikte değerlendirildiğinde, DEK ifadesindeki baskılanmanın ve ektopik DEK ekspresyonunun MM hücre hatlarının melphalana olan hassasiyeti üzerinde biyolojik ve istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmadığı sonucuna varılmıştır.

9.5. Hücre Döngüsü Analizi

Melphalan ile muamele edilen RPMI-8226 ve U266 hücrelerinin 72 saatlik bir zaman zarfında çoğalmalarındaki durma, hücre bölünme döngüsünde bir tutulum (arrest) olduğunu akla getirmektedir. Hücre döngüsündeki bu muhtemel tutulumu doğrulamak amacıyla, melphalan sitotoksosite deneyi, aynı koşullar kullanılarak tekrar edilmiştir.

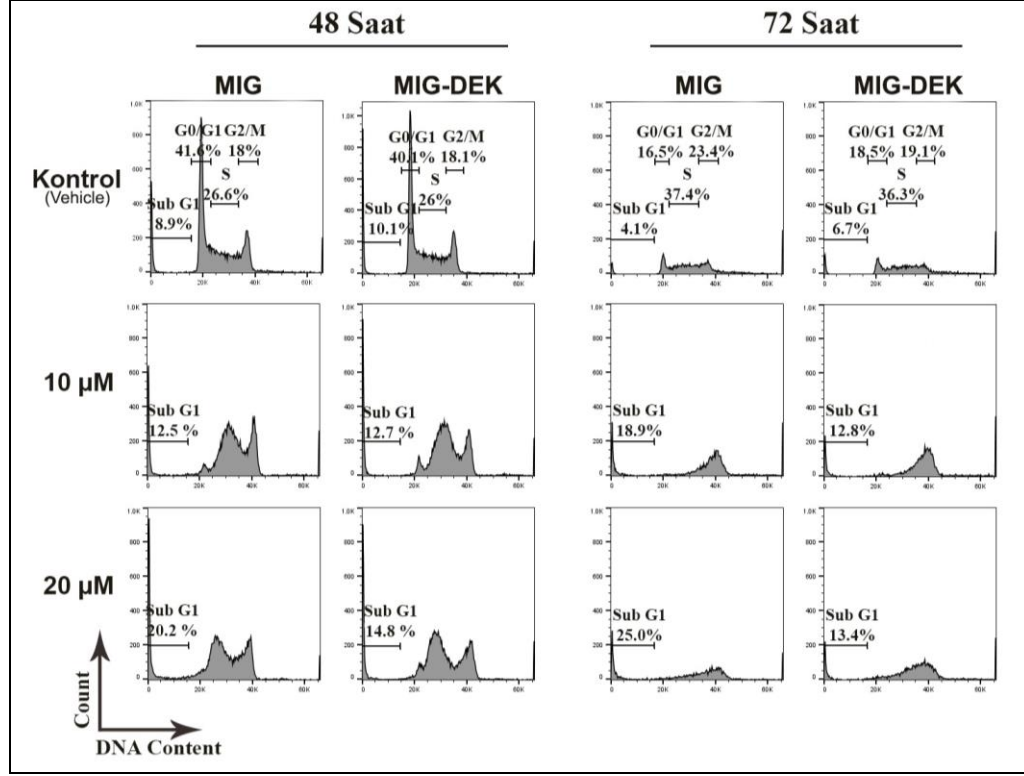
Sitotoksosite deneyine (Şekil 9.9, 9.10) paralel olarak hücre döngüsü analizi, 10 ve 20 μ M melphalan muamelesinin, kontrol ve DEK ifadesi susturulmuş RPMI-8226 hücrelerinde hücre döngüsünde tutulmaya (cell cycle arrest) neden olduğunu ve ilaçsız (vehicle) hücre gruplarına kıyasla melphalan muamelesinin, apoptotik (Sub G1 fazı) hücre yüzdesini artırdığını doğrulamıştır. Kontrol grubu (shNeg) ve DEK ifadesi baskılanan RPMI-8226 hücreleri birbiri ile kıyaslandığında melphalan muamelesinin 48. ve 72. saatinde, hücre döngüsündeki tutulum profili ve Sub G1 popülasyon oranlarında anlamlı bir fark meydana gelmediği tespit edildi (Şekil 9.13).



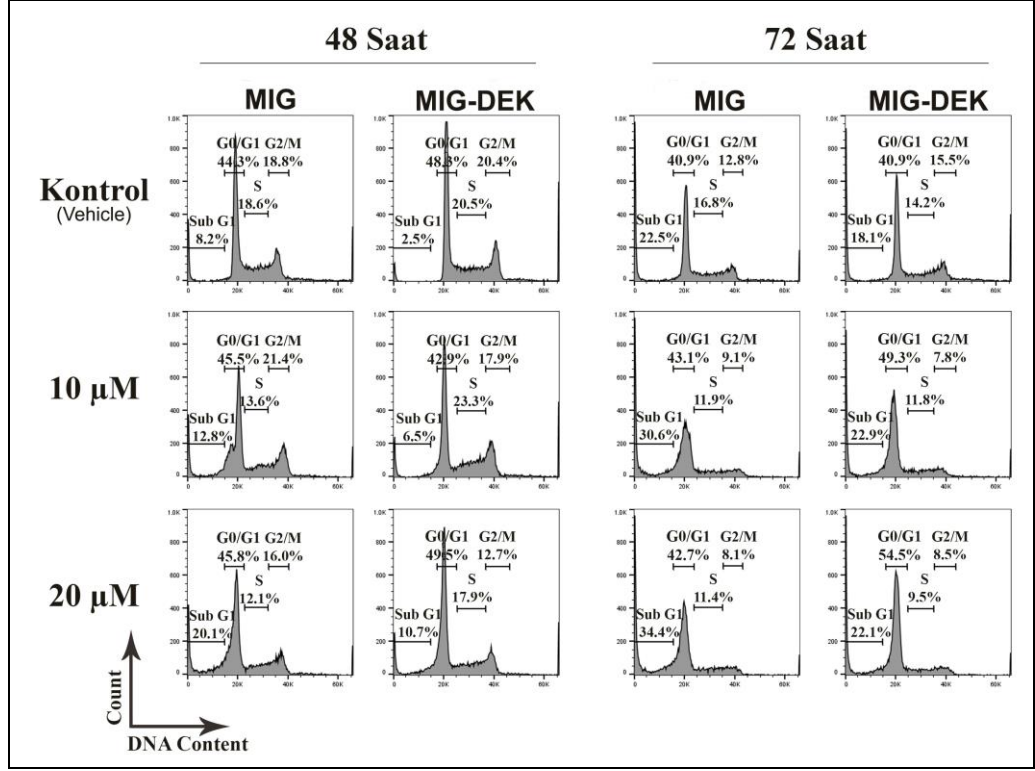
Şekil 9.13: Melphalan ile muamele edilen ve *DEK* gen ifadesi baskılanan RPMI-8226 hücrelerinin 48. saat (A) ve 72. saatteki (B) hücre döngüsü histogramları.

Benzer şekilde, 48 veya 72 saatlik 10 ve 20 μ M melphalan muamelesinin, hücre döngüsünde tutulmaya ve apoptotik hücre oranında (sub G1) hafif bir artışa neden olmasına rağmen kontrol (MIG) ve DEK'i aşırı ifade eden RPMI-8226

hücreleri (Şekil 9.14) ile U266 hücrelerinin (Şekil 9.15) hücre döngüsü dağılım profillerinde deney grupları arasında belirgin bir farklılık meydana gelmediği tespit edildi.



Şekil 9.14: Melphalan ile muamele edilen ve DEK'i aşırı ifade eden RPMI-8226 hücrelerinin 48. ve 72. saatteki hücre döngüsü histogramları.



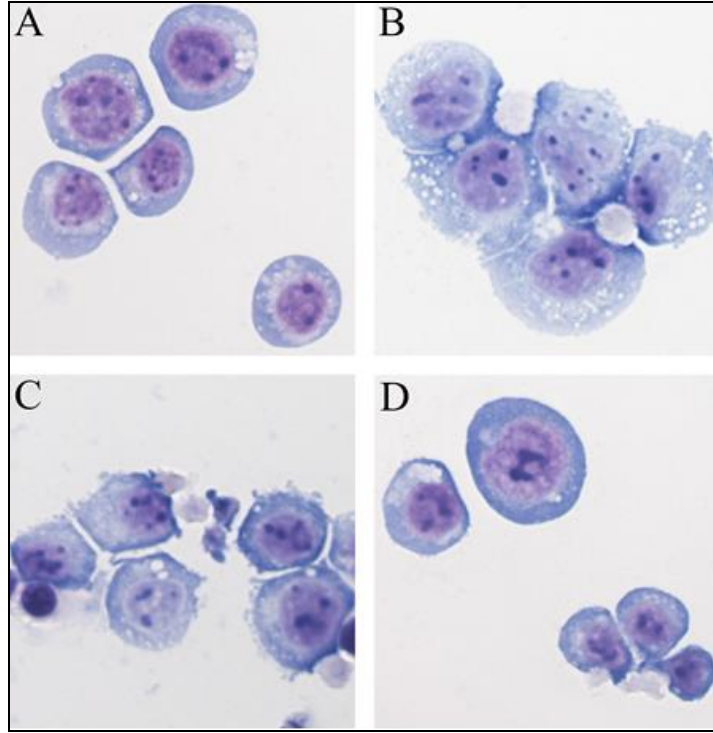
Şekil 9.15: Melphalan ile muamele edilen ve DEK'i aşırı ifade eden U266 hücrelerinin 48. ve 72. saatteki hücre döngüsü histogramları.

Yapılan hücre döngüsü analizleri, sitotoksosite deneylerinde zamana bağlı olarak hücre sayılarının sabit kalmasının, beklendiği üzere hücre döngüsünde meydana gelen tutulumdan (arrest) kaynaklandığını fakat melphalan muamelesine cevaben hücre döngüsü dağılımlarının MM hücre hatlarındaki DEK ifadesindeki kalıcı değişimlerden (baskılanma veya aşırı ekspresyon) etkilenmediğini ortaya koymuştur.

9.6. Giemsa Boyama ile Hücre Morfolojilerinin Karşılaştırılması

DEK ifadesinde baskılanmanın RPMI-8226 hücrelerinin morfolojik özellikleri üzerindeki olası etkilerini gözlemlemek amacıyla Giemsa boyama yapıldı. Giemsa boyama sonucunda ışık mikroskobu görüntüleri karşılaştırıldığında, MM hücre hatlarının plazma hücre morfolojisine uygun olarak çekirdeklerinin (mor) büyük ve perifere itilmiş, sitoplazmalarının (mavi) ise daha küçük olduğu ve hazırlanan preparatların büyük ve küçük hücreler olmak üzere heterojen popülasyonlardan

oluştugu gözlenmesine rağmen DEK'deki baskılanmanın RPMI-8226 hücrelerinin morfolojisi üzerinde belirgin bir fark oluşturmadığı tespit edilmiştir (Şekil 9.16).



Şekil 9.16: Giemsa ile boyanan infekte olmamış RPMI-8226 (A), sh-Negative (B), shDEK-B (C) ve shDEK-C (D) hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri (40X büyütme).

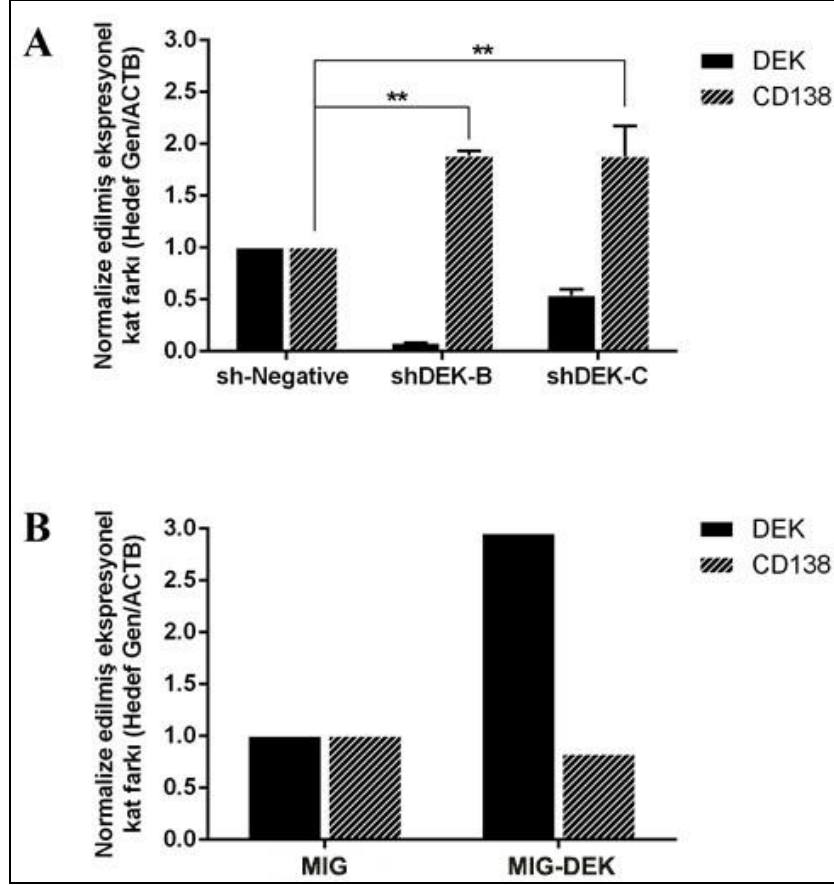
9.7. CD138 Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi

DEK ifadesindeki değişimlerin MM hücre hatlarının proliferatif özellikleri üzerinde bir etkisinin olmadığı görüldükten sonra DEK ifadesindeki değişimlerin plazma hücre karakteristiği üzerindeki olası etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla plazma hücrelerinin tanımlanmasında bir yüzey belirteci olarak kullanılan CD138 (Syndecan-1) ekspresyonunun RPMI-8226 hücrelerinde, DEK ifadesindeki artış veya azalışa bağlı olarak nasıl etkilendiği mRNA ve protein seviyesinde analiz edildi.

9.7.1. RT-qPCR ile CD138 Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi

RPMI-8226 hücrelerinde, DEK ifadesindeki baskılanmanın veya aşırı ekspresyonun *CD138* gen ifadesi üzerine etkisinin araştırılması amacıyla RT-qPCR yapılmıştır. DEK ifadesi baskılanan her iki hücre grubunda (shDEK-B ve shDEK-C)

CD138 mRNA seviyesinde negatif kontrole göre (sh-Negative) istatistiksel olarak anlamlı 2 katlık artış tespit edilirken, DEK'in aşırı ifadesinin CD138 ekspresyonunu etkilemediği görülmüştür (Şekil 9.17).

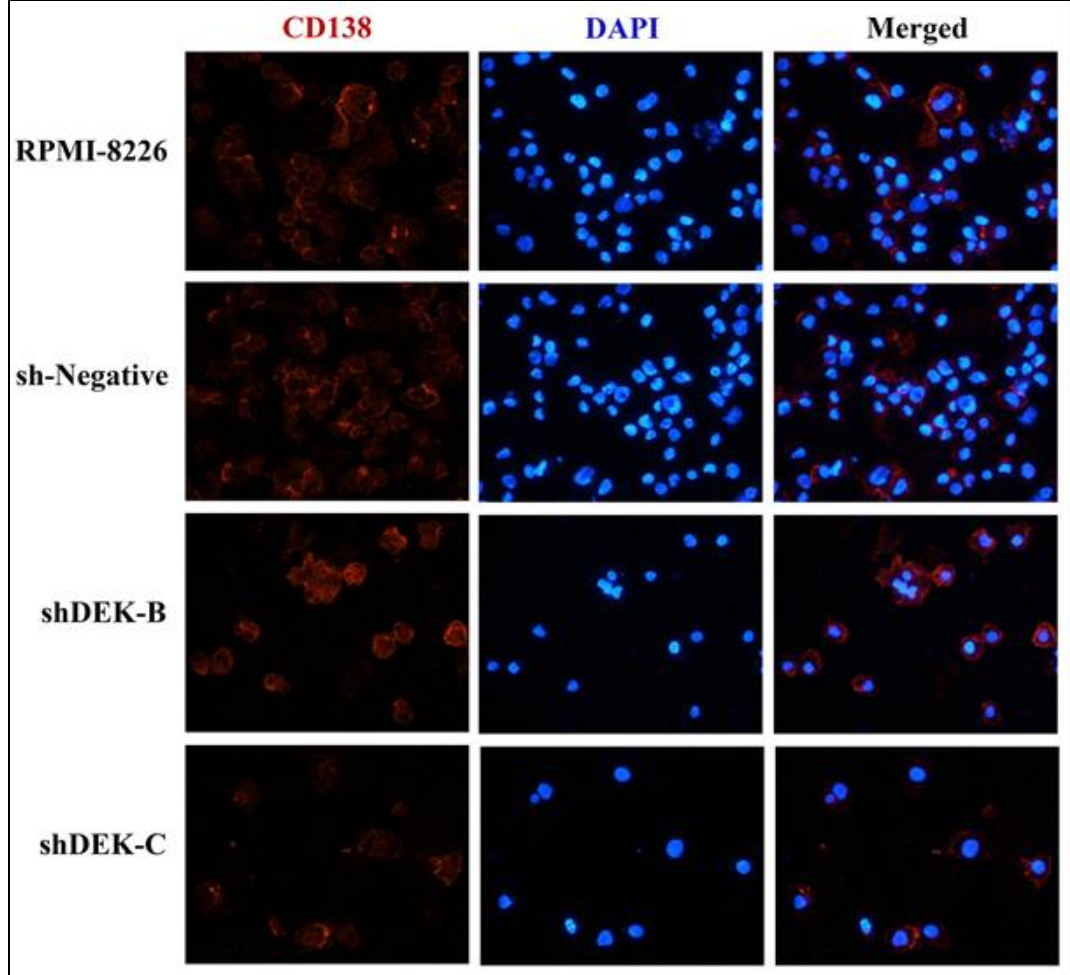


Şekil 9.17: DEK geni susturulan (A) ve aşırı ifade ettirilen (B) RPMI-8226 hücrelerinde DEK ve CD138 mRNA seviyelerinin karşılaştırmalı analizi (Bağımsız iki deneyin ortalaması (A) ve tek deneye ait (B) sonuçlar kullanılmıştır. Two-way ANOVA, ** $p < 0.01$).

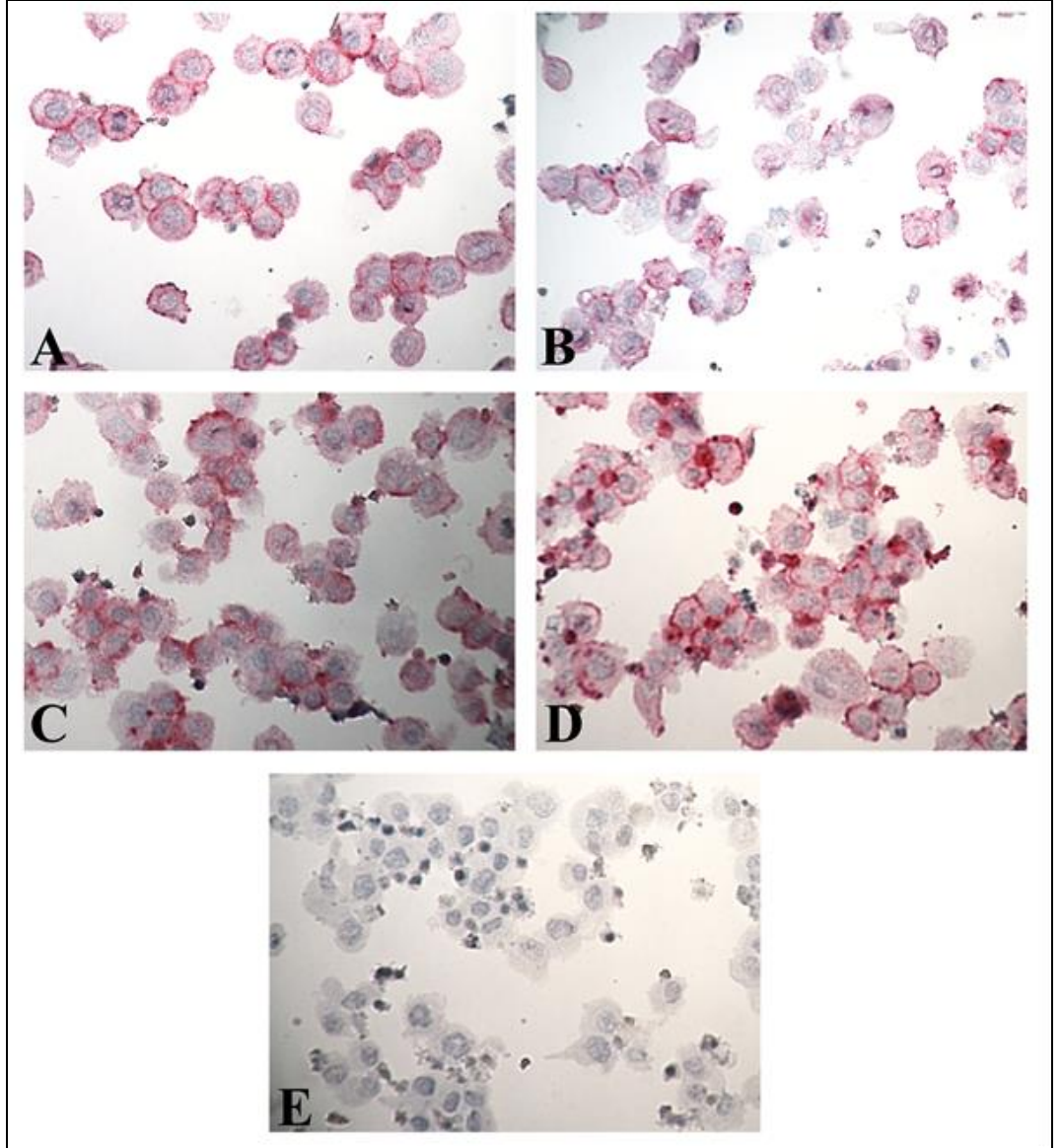
9.7.2. ICC ve IF Yöntemleriyle CD138 Protein Varlığı ve Lokalizasyonunun Tespiti

CD138 proteinin RPMI-8226 hücrelerindeki varlığının, lokalizasyonunun ve miktarının mikroskopik tespiti ve göreceli karşılaştırması için immünohistokimya (ICC) ve immünofloresan (IF) boyama yapılmıştır. Her iki boyama metodunda CD138 antikoru ile az bir sitoplazmik boyanmanın yanı sıra beklendiği üzere esas olarak hücre membranında boyanma göstermiştir (Şekil 9.18 ve 9.19). IF ve ICC boyama sonrası mikroskop görüntülerinin karşılaştırılması neticesinde shDEK-B ve shDEK-C hücre membranlarındaki CD138 boyamasında, modifiye edilmemiş RPMI-8226

(NI) ve sh-Negative kontrol hücrelerine kıyasla hafif bir artış olduğu görülmüştür (Şekil 9.18 ve Şekil 9.19). DEK'i aşırı ifade eden RPMI-8226 hücrelerinin sağlıklı morfolojilerinden dolayı daha düzgün IF/ICC boyama görüntüleri elde edilememiştir.



Şekil 9.18: RPMI-8226 hücrelerinin 20X ışık mikroskobu ile çekilmiş IF boyama görüntüleri (CD138, AlexaFluor-555-konjuge sekonder antikor ile kırmızı; hücre çekirdekleri ise DAPI ile mavi renkte boyanmıştır).

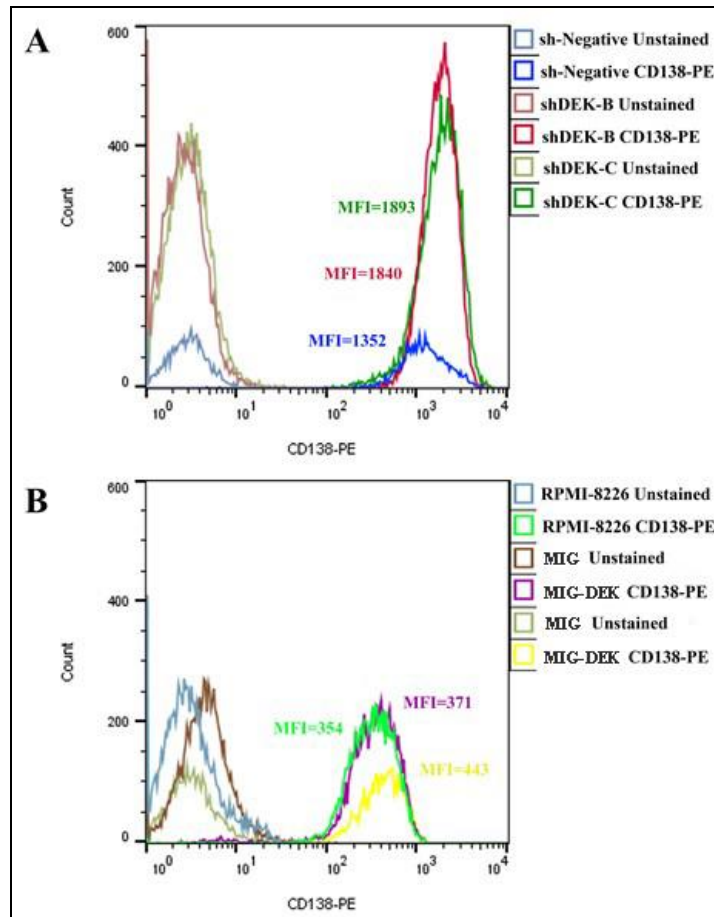


Şekil 9.19: DEK geni susturulan RPMI-8226 hücrelerine ait ICC boyaması görüntüleri (A: RPMI-8226, B: sh-Negative, C: shDEK-B, D: shDEK-C, E: Primer antikor uygulanmamış, sadece sekonder antikor uygulanmış kontrol boyaması. CD138 pembe, hücre çekirdekleri hemotoksilen ile mavi renkte boyanmıştır) (20X).

9.7.3. Akım Sitometrisi ile CD138 Analizi

DEK geni modifiye edilen RPMI-8226 hücrelerinde CD138⁺ ve CD138⁻ hücre popülasyonlarının saptanması ve CD138 protein düzeyindeki muhtemel ekspresyonel farklılığın hücreler arasındaki karşılaştırmalı kantitatif analizi akım sitometrisi ile yapılmıştır. Kontrol hücreleri, aşırı DEK ifadesi sağlanan ve DEK ifadesi susturulan RPMI-8226 hücrelerinin tümünün CD138⁺ hücre popülasyonundan oluştuğu görülmüştür (Şekil 9.20). DEK ifadesindeki değişimlerin hücreler arasındaki

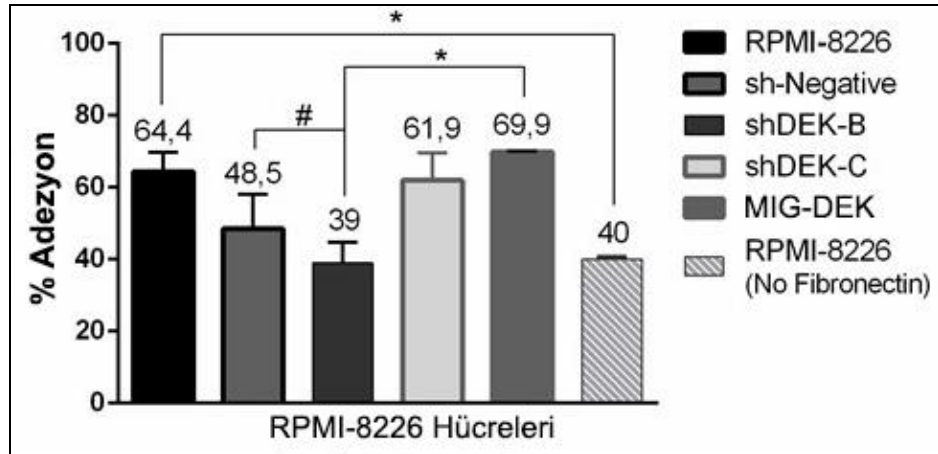
popülasyon yüzdelerini etkilemediği tespit edilmiştir. Aynı zamanda, analiz edilen örneklerin hücre yüzeyinde boyanan CD138 protein miktarı ile paralellik gösteren ‘Mean Fluorescence Intensity (MFI)’ değerleri karşılaştırılmış ve her bir hücre grubuna ait MFI değeri negatif kontrollerine ait MFI değerlerine bölünerek CD138 miktarındaki artış kat farkı olacak şekilde göreceli olarak hesaplanmıştır. *DEK* geni susturulan hücrelerin yüzeyinde ifade edilen CD138 miktarının (CD138-PE MFI), negatif kontrole göre (sh-Negative CD138-PE); shDEK-B hücrelerinde 1,36 katlık artış (sh-DEK-B MFI (1840) / kontrol MFI (1352)), sh-DEK-C hücrelerindeyse 1,4 katlık artış (sh-DEK-C MFI (1893) / kontrol MFI (1352)) gösterdiği (Şekil 9.20 A), ancak *DEK* genini aşırı ifade eden RPMI-8226 hücrelerinde (MIG-DEK CD138-PE) kontrole göre (MIG CD138-PE) CD138 protein seviyesinde bir fark olmadığı ($443/371=1.19$) (Şekil 9.20 B) saptanmıştır. Elde edilen sonuçların gerek RT-qPCR gerekse IF/ICC deneylerinden elde edilen sonuçlar ile benzerlik gösterdiği görüldü.



Şekil 9.20: *DEK* geni susturulan (A) ve aşırı ifade ettirilen (B) RPMI-8226 hücrelerinin yüzeyinde ifade edilen CD138 miktarının (CD138-PE MFI) karşılaştırmalı analizi (CD138-PE antikor özgünlüğü antikorsuz kontrol (unstained) grupları ile doğrulanmıştır).

9.8. Hücre Adezyon Deneyi

CD138, hücre-hücre ve hücre-ECM (extra cellular matrix) adezyonunda, hücre göçünde rol oynayan bir yüzey proteini olduğundan RPMI-8226 hücre yüzeyindeki CD138 ifadesinde meydana gelen *DEK* ekspresyonunun baskılanmasına bağlı artışın hücre adezyonu üzerindeki etkileri test edildi. Fibronektin kaplanmamış kuyulara ekilen RPMI-8226 (No Fibronectin) hücrelerinin adezyon oranına kıyasla, fibronektin kaplı kuyulara ekilen RPMI-8226 hücrelerinin adezyon oranında meydana gelen anlamlı %24,4'lük artış (* $p<0,05$) deneyin düzgün bir şekilde çalıştığını ve hücre adezyonunun fibronektin-bağımlı olarak gerçekleştiğini doğrulamıştır. RPMI-8226/shDEK-B, sh-Negative/shDEK-C, shDEK-C/MIG-DEK, RPMI-8226/MIG-DEK hücre ikililerine ait adezyon oranları karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemesine rağmen, *DEK* ifadesi susturulan (shDEK-B) hücrelerin adezyonunda; negatif kontrole (sh-Negatif) göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan %10'luk, *DEK*'i aşırı ifade eden (MIG-DEK) hücrelere kıyasla ise istatistiksel olarak anlamlı %31'lik (* $p<0,05$) bir azalma olduğu tespit edildi (Şekil 9.21). sh-Negatif hücrelerin adezyonunda ise MIG-DEK hücrelerine oranla, istatistiksel olarak anlamlı olmayan %21.5'lik azalma tespit edilmiştir (Şekil 9.21).



Şekil 9.21: DEK ekspresyonu modifiye edilen RPMI-8226 hücrelerinin adezyon oranlarının (%) belirlenmesi (Bağımsız iki deneyin ortalaması alınmıştır. T-test, * $p<0,05$, # istatistiksel olarak anlamsız).

10. SONUÇLAR

DEK ifadesinde meydana gelen değişimlerin MM hücrelerinin biyolojisi üzerindeki etkilerinin araştırılması amacıyla RPMI-8226 veya U266 hücre hatları DEK'e özgün sh-RNA'ları taşıyan lentiviral ve DEK cDNA'sını içeren retroviral virüs partikülleri ile infekte edildi. Akım sitometrisi ile infekte olan GFP^{pozitif} hücreler ayrıştırıldıktan sonra DEK'deki baskılanma ve aşırı ekspresyon mRNA ve protein düzeyinde doğrulandı. RT-qPCR analizi RPMI-8226 hücrelerindeki DEK ifadesinin, shNegative'e kıyasla shDEK-B ile yaklaşık %80, shDEK-C ile %70 ve shDEK-D ile %60 baskılandığını doğrulamıştır (Şekil 9.3). En fazla baskılanmanın olduğu shDEK-B ve shDEK-C hücreleri seçilerek deneylere devam edildi. DEK'in retroviral vektörler aracılığıyla ektopik ifadesinin ise RPMI-8226 hücrelerinde yaklaşık 2,8 kat, U266 hücrelerinde ise 12,3 kat artışla sonuçlandığı görüldü (Şekil 9.3). DEK gen ifadesindeki baskılanmanın ve aşırı ekspresyonun protein düzeyine de yansıdığı Western Blot ile doğrulanmıştır (Şekil 9.4).

shDEK-B ile DEK ifadesi baskılanan RPMI-8226 hücrelerinin 5 günlük bölünme eğrisinde sh-Negative'e göre değişim görülmezken, shDEK-C ile baskılanan hücrelerin çoğalma kapasitelerinin yaklaşık 1,6 kat azaldığı tespit edildi (Şekil 9.5). Bu azalışa shDEK-C hücrelerinin bölünme sürelerinde meydana gelen 15 saatlik uzamanın neden olduğu görüldü (Şekil 9.7). shDEK-B hücrelerine kıyasla endojen DEK ifadesinde daha az oranda baskılanmaya sebep olan shDEK-C hücrelerinde gözlenen bu fenotipin nedeni açık değildir. Bununla birlikte, her iki sh-RNA'nın (shDEK-B ve shDEK-C) DEK'in bilinen iki izoformunun [Yu et al., 2016] ifadesi üzerindeki susturucu etkisinin farklı olabileceği ve dolayısıyla sadece shDEK-C hücreleride böyle bir fenotipe yol açabileceği olası ihtimaller arasında bulunmaktadır. DEK'in RPMI-8226 ve U266 hücre hatlarında aşırı ekspresyonun da hücrelerin proliferatif özelliklerini ve bölünme sürelerini etkilemediği görüldü (Şekil 9.6, Şekil 9.8). Literatür incelendiğinde HKH'lerdeki proliferatif etkilerinin yanı sıra AML, CLL gibi hematopoetik kanserler ile bazı solid kanserlerdeki artan ifadesi ve onkogenik özellikleri, DEK'in MM'da da muhtemel bir onkogen olarak rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Fakat yaptığımız proliferasyon analizleri DEK'in, kalıcı baskılanmasının ve aşırı ekspresyonunun MM hücre hatlarının proliferasyonu üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığını ortaya koymuştur.

Klinikte bazı kanserlerin tedavisinde kullanılan melphalanın RPMI-8226 ve U266 hücre hatları üzerinde genotoksik etki gösterdiği bilinmektedir. Beklendiği üzere farklı konstrasyonlarda (10 μ M ve 20 μ M) uygulanan melphalan, zamana bağlı olarak (0, 24, 48, 72 saat) RPMI-8226 ve U266 hücrelerinin sayısında tutulum ve canlılıklarında düşüşe neden olsa da DEK ifadesindeki artış veya azalış bu sitotoksik etki üzerinde bir fark meydana getirmemiştir (Şekil 9.9-9.12). Akım sitometrisi analizi, hücre sayısının zamana bağlı olarak sabit kalmasının ve canlılıklarının azalmasının beklendiği üzere hücre döngüsündeki tutulum, yavaşlama ve sub G1 fazındaki apoptotik/ölü hücre popülasyonundaki artıştan kaynaklandığını fakat hücre döngüsü profillerinin DEK ekspresyonuna bağlı olarak belirgin şekilde değişmediğini ortaya koymuştur (Şekil 9.13-9.15). Yapılan çalışmalar DEK ifadesindeki değişimlerin melanom kanseri gibi bazı tümör hücrelerinin sitotoksik ajanlara karşı olan hassasiyetini etkilediğini ortaya koymasına rağmen [Khodadoust et al., 2009], bu tezde elde edilen veriler, RPMI-8226 ve U266 hücre hatlarının melphalan hassasiyetinin DEK ifadesindeki değişimden belirgin şekilde etkilemediğini göstermiştir.

Normal ve anormal plazma hücreleri, mikroskop altında sitoplazması geniş ve çekirdeği periferite itilmiş şekilde görünmektedir. RPMI-8226 hücrelerinin de benzer bir morfolojide olduğu; DEK ifadesinin kalıcı olarak susturulduğu RPMI-8226 hücrelerinin morfolojilerinde kontrol shRNA ile infekte edilmiş (sh-Negative) hücrelere göre belirgin bir fark oluşmadığı görüldü (Şekil 9.16).

MM hücrelerinin de normal plazma hücrelerine benzer şekilde hiyerarşik bir farklılaşma sürecinden geçerek meydana geldikleri düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar MM hücrelerinin genellikle CD138⁺ plazma hücresi karakterinde olduğunu göstermektedir. CD138 (Syndecan-1) hücre-yüzey ve hücre-hücre etkileşimlerinde rol oynayan bir membran proteindir ve plazma hücrelerinin farklılaşma sürecinin takibi ile sağlıklı ve habis plazma hücrelerinin (olgunlaşmış) tespitinde en sık kullanılan yüzey belirteçidir. Labortauvarımızda daha önce yürütülen çalışmalarda, MM hastalarının CD138 pozitif kemik iliği hücrelerinde DEK ekspresyonun 2 ile 30 kat arasında azalma gösterdiği tespit edilmiştir [Caliskaner et al., 2017]. Bu veriler dikkate alınarak, bu tez çalışmasında DEK ifadesine bağlı olarak CD138 ekspresyonunda değişim olup olmadığı RPMI-8226 hücrelerinde test edildi. RPMI-8226 hücrelerinde DEK ifadesinin iki farklı shRNA (shDEK-B ve shDEK-C) ile kalıcı olarak susturulması, CD138 gen ifadesinde sh-

Negative kontrole göre 2 katlık artışa neden olurken, bu hücrelerde DEK'in aşırı ifadesinin *CD138* ifadesinde bir fark oluşturmadığı RT-qPCR ile tespit edildi (Şekil 9.17). *CD138* antikoru kullanılarak yapılan IF ve ICC boyama, beklendiği üzere *CD138* proteininin, RPMI-8226 hücrelerinin yüzeyinde lokalize olduğunu gösterdi. Kantitatif PCR sonucu ile uyumlu olarak özellikle shDEK-B hücrelerinde (DEK'in kalıcı olarak baskılandığı RPMI-8226 hücrelerinin yüzeyinde) *CD138* antikoruyla daha yoğun bir boyanma gözlenmiştir (Şekil 9.18, Şekil 9.19). İlave olarak, *CD138* ifadesi akım sitometrisiyle de analiz edildi ve literatürle uyumlu olarak kontrol RPMI-8226 hücrelerinin tamamının *CD138*-pozitif olduğu tespit edildi. Akım sitometrisinde ölçülen *CD138*-PE floresan sinyal yoğunluğu (MFI) hücre yüzeyinde ifade edilen protein miktarına bağlı olarak fark göstermektedir. Akım sitometrisi analizlerinden elde edilen shDEK-B, shDEK-C, MIG-DEK hücrelerine ait MFI değerlerini, kontrol gruplarına (sh-Negative veya MIG) ait değerlere bölerek yaptığımız analiz, hücre yüzeyinde ifade edilen *CD138* protein miktarındaki göreceli değişimi ifade etmektedir. Hesaplanan göreceli değerler (shDEK-B/sh-Negative: 1,36; shDEK-C/sh-Negative: 1,4; MIG-DEK/MIG:1,1), RPMI-8226 hücrelerindeki DEK baskılamasının *CD138*'in yüzey ekspresyonunda hafif bir artışa neden olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 9.20). Hücre adezyonunda rol oynayan *CD138*'in ifadesindeki DEK baskılanmasına bağlı hafif düşüşün sadece shDEK-B RPMI-8226 hücrelerinin yüzey adezyonunda sh-Negative'e görece %10'luk bir azalmaya neden olduğu fakat bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi (Şekil 9.21).

Literatür verileri DEK'in farklı hücre tiplerinde farklı fonksiyonlar üstlendiğini ortaya koymuştur. Bazı solid ve hematolojik kanserlerde DEK ifadesinin değiştiği ve DEK ifadesindeki endojen veya ektopik değişimlerin özellikle proliferasyon, tümör gelişimi, ilaç direnci başta olmak üzere önemli hücresel fonksiyonlar üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir [Riveiro-Falkenbach and Soengas, 2010]. Literatürdeki bilgilerden yola çıkarak DEK ifadesindeki değişimin MM hücre hatlarının biyolojisi üzerinde olası etkilerini tespit etmeyi hedefleyen bu doktora tezi kapsamında, RPMI-8226 ve U266 hücrelerinin proliferasyon, melphalan hassasiyeti ve hücre döngüsü profillerinin DEK ifadesindeki artış veya azalıştan belirgin şekilde etkilenmediği tespit edildi. Ancak, hücrelerin farklılaşma seviyesini yansıtan ve adezyonunda rol oynayan *CD138* ekspresyonunun DEK ifadesindeki kalıcı baskılanmaya bağlı olarak RNA ve protein seviyesinde artış gösterdiği tespit edildi. Laboratuvarımızda

yürütülen yüksek lisans tezleri kapsamında arşivlenmiş parafin doku örneklerinde DEK kopya sayısı ve İHK yöntemi ile DEK proteininin ifadesi araştırılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda gerek sağlıklı gerekse neoplastik CD138-pozitif plazma hücrelerinde DEK proteininin bulunmadığı (ya da tespit edilemeyecek kadar az olduğu) ancak öncül B hücrelerden köken alan ve CD138 antikoru ile boyanma göstermeyen kanser hücrelerindeyse DEK proteinin yoğun olarak ifade edildiği tespit edilmiştir [Özdilek, 2013], [Çakar, 2014]. Broxmeyer ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ise ekspresyonu öncül miyeloid kan hücrelerinde yüksek olan DEK'in hematopoetik kök hücrelerin proliferasyonunu artırdığını fakat farklılaşma seviyesi ilerlemiş miyeloid progenitör hücrelerin fare kemik iliğindeki sayısını azalttığını ortaya koymuştur [Broxmeyer et al., 2012], [Broxmeyer et al., 2013]. Bununla birlikte HKH'lerde yüksek olan DEK'in, progenitör hücrelerin miyeloid seri hücrelerine farklılaşmasında etkin rol oynadığı ve bu süreçte ekspresyonunun belirgin bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir [Logan et al., 2014]. Hematopoetik öncül hücreler ve CD138-negatif B hücrelerdeki yüksek DEK ifadesinin, farklılaşmanın geç safhalarına doğru hücrelerin azalan proliferatif aktivitesine bağlı olarak terminal farklılaşmasını tamamlayan CD138-pozitif plazma hücrelerinde kaybolması DEK'in plazma hücresi gelişiminde hücrelerin proliferasyon-farklılaşma dengesinde fonksiyonel olabileceğini akla getirmektedir. Başka bir ifadeyle DEK'in azalan ekspresyonu ile plazma hücrelerinin terminal farklılaşması arasında pozitif bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Nitekim RPMI-8226 hücrelerinde var olan DEK ifadesinin shRNA'lar ile büyük oranda ortadan kaldırılmasının farklılaşma belirteci olan CD138'in ekspresyonunda hafif bir artışla sonuçlanması bu kanıyı desteklemektedir. DEK ifadesindeki değişime bağlı olarak CD138 ekspresyonunda görülen artışın düşük miktarda olması, deneylerimizde kullanılan hücre hattının terminal farklılaşmasını tamamlamasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Diğer taraftan CD138⁺ plazma hücrelerinden köken alan hücre hatlarının proliferasyon ve melphalan hassasiyetinin değişen DEK ifadesinden etkilenmemesi literatürde onkoprotein olarak tanımlanan bu proteinin, MM patogenizinde tamamen etkisiz olduğu anlamına gelmemektedir. Plazma hücrelerinin, DEK ifadesinin yüksek olduğu CD138⁻ B hücrelerinden köken aldığı göz önünde bulundurulduğunda DEK ifadesinin terminal farklılaşma öncesinde B hücrelerinin klonal çoğalmasını artırarak kanserleşmeye neden olabileceği araştırılmaya değer ihtimaller arasındadır. Tamamlanan doktora tezi ile DEK'in MM hücreleri üzerindeki farklı etkileri ilk defa

ortaya konularak uluslararası literatüre kazandırılmış ve yayınladığımız sonuçlar DEK'in B lenfositlerin plazma hücresine farklılaşması sürecindeki olası rolleri hakkında hipotetik düşüncelerin ortaya çıkmasına katkı sağlayacaktır. Dolayısıyla DEK'in farklı evrelerdeki B lenfositlerinden elde edilen primer hücrelerde kalıcı olarak susturulması ve ektopik ifadesi, bu onkogenin gerek sağlıklı plazma hücresi farklılaşma sürecinde gerekse MM patogeneziindeki rollerinin aydınlatılmasında daha ayrıntılı bir model ortaya koyacaktır.

Bu doktora tez çalışması TÜBİTAK KBAG 212T108 no'lu 1001 ve Gebze Teknik Üniversitesi BAP-2015-A15 nolu projeleri ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abed N. S., Chace J. H., Fleming A. L., Cowdery J. S., (1994), "Interferon-gamma regulation of B lymphocyte differentiation: activation of B cells is a prerequisite for IFN-gamma-mediated inhibition of B cell differentiation", *Cell Immunology*, 153 (2), 356-366.
- Agarwal A., Ghobrial I. M., (2013), "Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma: a review of the current understanding of epidemiology, biology, risk stratification, and management of myeloma precursor disease", *Clinical Cancer Research*, 19 (5), 985-994.
- Alexiadis V., Waldmann T., Andersen J., Mann M., Knippers R., Gruss C., (2000), "The protein encoded by the proto-oncogene DEK changes the topology of chromatin and reduces the efficiency of DNA replication in a chromatin-specific manner", *Genes & Development*, 14 (11), 1308-1312.
- Alinikula J., Nera K. P., Junttila S., Lassila O., (2011), "Alternate pathways for Bcl6-mediated regulation of B cell to plasma cell differentiation", *European Journal of Immunology*, 41 (8), 2404-2413.
- Allen C. D., Okada T., Cyster J. G., (2007), "Germinal-center organization and cellular dynamics", *Immunity*, 27 (2), 190-202.
- Allman D., Li J., Hardy R. R., (1999), "Commitment to the B lymphoid lineage occurs before DH-JH recombination", *Journal of Experimental Medicine*, 189 (4), 735-740.
- Allman D., Pillai S., (2008), "Peripheral B cell subsets", *Current Opinion Immunology*, 20 (2), 149-157.
- Annunziata C. M., Hernandez L., Davis R. E., Zingone A., Lamy L., Lam L. T., Hurt E. M., Shaffer A. L., Kuehl W. M., Staudt L. M., (2011), "A mechanistic rationale for MEK inhibitor therapy in myeloma based on blockade of MAF oncogene expression", *Blood*, 117 (8), 2396-2404.
- Arana E., Harwood N. E., Batista F. D., (2008), "Regulation of integrin activation through the B-cell receptor", *Journal of Cell Science*, 121 (Pt 14), 2279-2286.
- Avet-Loiseau H., Malard F., Campion L., Magrangeas F., Sebban C., Lioure B., Decaux O., Lamy T., Legros L., Fuzibet J. G., Michallet M., Corront B., Lenain P., Hulin C., Mathiot C., Attal M., Facon T., Harousseau J. L., Minvielle S., Moreau P., Intergroupe Francophone du M., (2011), "Translocation t(14;16) and multiple myeloma: is it really an independent prognostic factor?", *Blood*, 117 (6), 2009-2011.
- Barczyk M., Carracedo S., Gullberg D., (2010), "Integrins", *Cell Tissue Research*, 339 (1), 269-280.

Basso K., Dalla-Favera R., (2010), "BCL6: master regulator of the germinal center reaction and key oncogene in B cell lymphomagenesis", *Advances in Immunology*, 105 193-210.

Basso K., Dalla-Favera R., (2012), "Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells", *Immunological Reviews*, 247 (1), 172-183.

Bayraktar U. D., Bashir Q., Qazilbash M., Champlin R. E., Ciurea S. O., (2013), "Fifty years of melphalan use in hematopoietic stem cell transplantation", *Biology of Blood Marrow Transplantation*, 19 (3), 344-356.

Bemark M., (2015), "Translating transitions - how to decipher peripheral human B cell development", *Journal of Biomedical Research*, 29 (4), 264-284.

Bergsagel P. L., Kuehl W. M., (2001), "Chromosome translocations in multiple myeloma", *Oncogene*, 20 (40), 5611-5622.

Bergsagel P. L., Kuehl W. M., Zhan F., Sawyer J., Barlogie B., Shaughnessy J., Jr., (2005), "Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma", *Blood*, 106 (1), 296-303.

Betts J. G., Desaix P., Johnson J. E., Korol O., Kruse D., Poe B., Wise J., Womble M. D., Young K. A., (2013), "Anatomy & Physiology", OpenStax College, Rice University.

Bianchi G., Ghobrial I. M., (2014), "Biological and Clinical Implications of Clonal Heterogeneity and Clonal Evolution in Multiple Myeloma", *Current Cancer Therapy Reviews*, 10 (2), 70-79.

Bianchi G., Munshi N. C., (2015), "Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma", *Blood*, 125 (20), 3049-3058.

Blanc V., Bousseau A., Caron A., Carrez C., Lutz R. J., Lambert J. M., (2011), "SAR3419: an anti-CD19-Maytansinoid Immunoconjugate for the treatment of B-cell malignancies", *Clinical Cancer Research*, 17 (20), 6448-6458.

Blum J. S., Wearsch P. A., Cresswell P., (2013), "Pathways of antigen processing", *Annual Review of Immunology*, 31 443-473.

Borset M., Hjertner O., Yaccoby S., Epstein J., Sanderson R. D., (2000), "Syndecan-1 is targeted to the uropods of polarized myeloma cells where it promotes adhesion and sequesters heparin-binding proteins", *Blood*, 96 (7), 2528-2536.

Bossen C., Schneider P., (2006), "BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling", *Seminars in Immunology*, 18 (5), 263-275.

Braun D., Caramalho I., Demengeot J., (2002), "IFN-alpha/beta enhances BCR-dependent B cell responses", *International Immunology*, 14 (4), 411-419.

Broderick P., Chubb D., Johnson D. C., Weinhold N., Forsti A., Lloyd A., Olver B., Ma Y., Dobbins S. E., Walker B. A., Davies F. E., Gregory W. A., Childs J. A., Ross F. M., Jackson G. H., Neben K., Jauch A., Hoffmann P., Muhleisen T. W., Nothen

M. M., Moebus S., Tomlinson I. P., Goldschmidt H., Hemminki K., Morgan G. J., Houlston R. S., (2011), "Common variation at 3p22.1 and 7p15.3 influences multiple myeloma risk", *Nature Genetics*, 44 (1), 58-61.

Broxmeyer H. E., Kappes F., Mor-Vaknin N., Legendre M., Kinzfogel J., Cooper S., Hangoc G., Markovitz D. M., (2012), "DEK regulates hematopoietic stem engraftment and progenitor cell proliferation", *Stem Cells Development*, 21 (9), 1449-1454.

Broxmeyer H. E., Mor-Vaknin N., Kappes F., Legendre M., Saha A. K., Ou X., O'Leary H., Capitano M., Cooper S., Markovitz D. M., (2013), "Concise review: role of DEK in stem/progenitor cell biology", *Stem Cells*, 31 (8), 1447-1453.

Cai Y., Sablina A. A., (2016), "Cancer-associated chromosomal deletions: Size makes a difference", *Cell Cycle*, 15 (21), 2850-2851.

Caliskaner Z. O., Cakar T., Ozcelik E., Ozdilek A., Kim A. S., Dogan O., Bosompem A., Grosveld G., Saka B., Kandilci A., (2017), "DEK protein level is a biomarker of CD138positive normal and malignant plasma cells", *PLoS One*, 12 (5), e0178025.

Cambier J. C., Gauld S. B., Merrell K. T., Vilen B. J., (2007), "B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells?", *Nature Reviews Immunology*, 7 (8), 633-643.

Cammenga J., Mulloy J. C., Berguido F. J., MacGrogan D., Viale A., Nimer S. D., (2003), "Induction of C/EBPalpha activity alters gene expression and differentiation of human CD34+ cells", *Blood*, 101 (6), 2206-2214.

Campillos M., Garcia M. A., Valdivieso F., Vazquez J., (2003), "Transcriptional activation by AP-2alpha is modulated by the oncogene DEK", *Nucleic Acids Research*, 31 (5), 1571-1575.

Carro M. S., Spiga F. M., Quarto M., Di Ninni V., Volorio S., Alcalay M., Muller H., (2006), "DEK Expression is controlled by E2F and deregulated in diverse tumor types", *Cell Cycle*, 5 (11), 1202-1207.

Carsetti R., (2000), "The development of B cells in the bone marrow is controlled by the balance between cell-autonomous mechanisms and signals from the microenvironment", *Journal of Experimental Medicine*, 191 (1), 5-8.

Cavellan E., Asp P., Percipalle P., Farrants A. K., (2006), "The WSTF-SNF2h chromatin remodeling complex interacts with several nuclear proteins in transcription", *Journal of Biological Chemistry*, 281 (24), 16264-16271.

Chan T. D., Wood K., Hermes J. R., Butt D., Jolly C. J., Basten A., Brink R., (2012), "Elimination of germinal-center-derived self-reactive B cells is governed by the location and concentration of self-antigen", *Immunity*, 37 (5), 893-904.

Chapman M. A., Lawrence M. S., Keats J. J., Cibulskis K., Sougnez C., Schinzel A. C., Harview C. L., Brunet J. P., Ahmann G. J., Adli M., Anderson K. C., Ardlie K. G., Auclair D., Baker A., Bergsagel P. L., Bernstein B. E., Drier Y., Fonseca R., Gabriel S. B., Hofmeister C. C., Jagannath S., Jakubowiak A. J., Krishnan A., Levy

J., Liefeld T., Lonial S., Mahan S., Mfuko B., Monti S., Perkins L. M., Onofrio R., Pugh T. J., Rajkumar S. V., Ramos A. H., Siegel D. S., Sivachenko A., Stewart A. K., Trudel S., Vij R., Voet D., Winckler W., Zimmerman T., Carpten J., Trent J., Hahn W. C., Garraway L. A., Meyerson M., Lander E. S., Getz G., Golub T. R., (2011), "Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma", *Nature*, 471 (7339), 467-472.

Chen Q., Van der Sluis P. C., Boulware D., Hazlehurst L. A., Dalton W. S., (2005), "The FA/BRCA pathway is involved in melphalan-induced DNA interstrand cross-link repair and accounts for melphalan resistance in multiple myeloma cells", *Blood*, 106 (2), 698-705.

Chng W. J., Gonzalez-Paz N., Price-Troska T., Jacobus S., Rajkumar S. V., Oken M. M., Kyle R. A., Henderson K. J., Van Wier S., Greipp P., Van Ness B., Fonseca R., (2008), "Clinical and biological significance of RAS mutations in multiple myeloma", *Leukemia*, 22 (12), 2280-2284.

Chotinantakul K., Lee-anansaksiri W., (2012), "Hematopoietic stem cell development, niches, and signaling pathways", *Bone Marrow Research*, 2012 270425.

Chu V. T., Berek C., (2013), "The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow", *Immunological Reviews*, 251 (1), 177-188.

Chung J. B., Silverman M., Monroe J. G., (2003), "Transitional B cells: step by step towards immune competence", *Trends in Immunology*, 24 (6), 343-349.

Cigudosa J. C., Rao P. H., Calasanz M. J., Otero M. D., Michaeli J., Jhanwar S. C., Chaganti R. S., (1998), "Characterization of nonrandom chromosomal gains and losses in multiple myeloma by comparative genomic hybridization", *Blood*, 91 (8), 3007-3010.

Cleary J., Sitwala K. V., Khodadoust M. S., Kwok R. P., Mor-Vaknin N., Cebrat M., Cole P. A., Markovitz D. M., (2005), "p300/CBP-associated factor drives DEK into interchromatin granule clusters", *Journal of Biological Chemistry*, 280 (36), 31760-31767.

Cobaleda C., Schebesta A., Delogu A., Busslinger M., (2007), "Pax5: the guardian of B cell identity and function", *Nature Immunology*, 8 (5), 463-470.

Corfe S. A., Paige C. J., (2012), "The many roles of IL-7 in B cell development; mediator of survival, proliferation and differentiation", *Seminars in Immunology*, 24 (3), 198-208.

Crotty S., (2015), "A brief history of T cell help to B cells", *Nature Reviews Immunology*, 15 (3), 185-189.

Çakar T., (2014), "Multiple Miyeloma hastalarında Dek geninin kopya sayısı ve ekspresyon seviyesinin belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü.

De Silva N. S., Simonetti G., Heise N., Klein U., (2012), "The diverse roles of IRF4 in late germinal center B-cell differentiation", *Immunological Rev*, 247 (1), 73-92.

Delogu A., Schebesta A., Sun Q., Aschenbrenner K., Perlot T., Busslinger M., (2006), "Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells", *Immunity*, 24 (3), 269-281.

Demengeot J., Vasconcellos R., Modigliani Y., Grandien A., Coutinho A., (1997), "B lymphocyte sensitivity to IgM receptor ligation is independent of maturation stage and locally determined by macrophage-derived IFN-beta", *International Immunology*, 9 (11), 1677-1685.

Dib A., Gabrea A., Glebov O. K., Bergsagel P. L., Kuehl W. M., (2008), "Characterization of MYC translocations in multiple myeloma cell lines", *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, (39), 25-31.

Dispenzieri A., Kyle R., Merlini G., Miguel J. S., Ludwig H., Hajek R., Palumbo A., Jagannath S., Blade J., Lonial S., Dimopoulos M., Comenzo R., Einsele H., Barlogie B., Anderson K., Gertz M., Harousseau J. L., Attal M., Tosi P., Sonneveld P., Boccadoro M., Morgan G., Richardson P., Sezer O., Mateos M. V., Cavo M., Joshua D., Turesson I., Chen W., Shimizu K., Powles R., Rajkumar S. V., Durie B. G., International Myeloma Working G., (2009), "International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders", *Leukemia*, 23 (2), 215-224.

Dong X., Michelis M. A., Wang J., Bose R., DeLange T., Reeves W. H., (1998), "Autoantibodies to DEK oncoprotein in a patient with systemic lupus erythematosus and sarcoidosis", *Arthritis & Rheumatology*, 41 (8), 1505-1510.

Doulatov S., Notta F., Laurenti E., Dick J. E., (2012), "Hematopoiesis: a human perspective", *Cell Stem Cell*, 10 (2), 120-136.

Dullaers M., De Bruyne R., Ramadani F., Gould H. J., Gevaert P., Lambrecht B. N., (2012), "The who, where, and when of IgE in allergic airway disease", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129 (3), 635-645.

Durrbaum M., Storchova Z., (2016), "Effects of aneuploidy on gene expression: implications for cancer", *FEBS Journal*, 283 (5), 791-802.

Esma F., Salvini M., Troia R., Boccadoro M., Larocca A., Pautasso C., (2017), "Melphalan hydrochloride for the treatment of multiple myeloma", *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 18 (11), 1127-1136.

Fairfax K. A., Kallies A., Nutt S. L., Tarlinton D. M., (2008), "Plasma cell development: from B-cell subsets to long-term survival niches", *Seminars in Immunology*, 20 (1), 49-58.

Fairfield H., Falank C., Avery L., Reagan M. R., (2016), "Multiple myeloma in the marrow: pathogenesis and treatments", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1364 32-51.

Falco P., Brinchen S., Avonto I., Gay F., Morabito F., Boccadoro M., Palumbo A., (2007), "Melphalan and its role in the management of patients with multiple myeloma", *Expert Review of Anticancer Therapy*, 7 (7), 945-957.

Furukawa Y., Kikuchi J., (2015), "Molecular pathogenesis of multiple myeloma", *Int Journal of Clinical Oncology*, 20 (3), 413-422.

Gamble M. J., Fisher R. P., (2007), "SET and PARP1 remove DEK from chromatin to permit access by the transcription machinery", *Nature Structural & Molecular Biology*, 14 (6), 548-555.

Gerecke C., Fuhrmann S., Striffler S., Schmidt-Hieber M., Einsele H., Knop S., (2016), "The Diagnosis and Treatment of Multiple Myeloma", *Dtsch Arztebl Int*, 113 (27-28), 470-476.

Gharbaran R., (2015), "Advances in the molecular functions of syndecan-1 (SDC1/CD138) in the pathogenesis of malignancies", *Critical Reviews of Oncology/Hematology*, 94 (1), 1-17.

Ghobrial I. M., Landgren O., (2014), "How I treat smoldering multiple myeloma", *Blood*, 124 (23), 3380-3388.

Giacinti C., Giordano A., (2006), "RB and cell cycle progression", *Oncogene*, 25 (38), 5220-5227.

Gkotszamanidou M., Sfrikakis P. P., Kyrtopoulos S. A., Bamia C., Dimopoulos M. A., Souliotis V. L., (2014), "Chromatin structure, transcriptional activity and DNA repair efficiency affect the outcome of chemotherapy in multiple myeloma", *British Journal of Cancer*, 111 (7), 1293-1304.

Gonzalez D., van der Burg M., Garcia-Sanz R., Fenton J. A., Langerak A. W., Gonzalez M., van Dongen J. J., San Miguel J. F., Morgan G. J., (2007), "Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma", *Blood*, 110 (9), 3112-3121.

Goodnow C. C., Sprent J., Fazekas de St Groth B., Vinuesa C. G., (2005), "Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity", *Nature*, 435 (7042), 590-597.

Grasemann C., Gratias S., Stephan H., Schuler A., Schramm A., Klein-Hitpass L., Rieder H., Schneider S., Kappes F., Eggert A., Lohmann D. R., (2005), "Gains and overexpression identify DEK and E2F3 as targets of chromosome 6p gains in retinoblastoma", *Oncogene*, 24 (42), 6441-6449.

Greipp P. R., San Miguel J., Durie B. G., Crowley J. J., Barlogie B., Blade J., Boccadoro M., Child J. A., Avet-Loiseau H., Kyle R. A., Lahuerta J. J., Ludwig H., Morgan G., Powles R., Shimizu K., Shustik C., Sonneveld P., Tosi P., Turesson I., Westin J., (2005), "International staging system for multiple myeloma", *Journal of Clinical Oncology*, 23 (15), 3412-3420.

Griffith J. W., Sokol C. L., Luster A. D., (2014), "Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity", *Annual Review of Immunology*, 32 659-702.

Habib T., Nelson A., Kaushansky K., (2003), "IL-21: a novel IL-2-family lymphokine that modulates B, T, and natural killer cell responses", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112 (6), 1033-1045.

Hallek M., Bergsagel P. L., Anderson K. C., (1998), "Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process", *Blood*, 91 (1), 3-21.

Hanamura I., Stewart J. P., Huang Y., Zhan F., Santra M., Sawyer J. R., Hollmig K., Zangarri M., Pineda-Roman M., van Rhee F., Cavallo F., Burington B., Crowley J., Tricot G., Barlogie B., Shaughnessy J. D., Jr., (2006), "Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation", *Blood*, 108 (5), 1724-1732.

Hardy R. R., Hayakawa K., (2001), "B cell development pathways", *Annual Review of Immunology*, 19 595-621.

Harwood N. E., Batista F. D., (2010), "Early events in B cell activation", *Annual Review Immunology*, 28 185-210.

Heine G., Drozdenko G., Grun J. R., Chang H. D., Radbruch A., Worm M., (2014), "Autocrine IL-10 promotes human B-cell differentiation into IgM- or IgG-secreting plasmablasts", *European Journal of Immunology*, 44 (6), 1615-1621.

Hoffman W., Lakkis F. G., Chalasani G., (2016), "B Cells, Antibodies, and More", *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 11 (1), 137-154.

Hollenbach A. D., McPherson C. J., Mientjes E. J., Iyengar R., Grosveld G., (2002), "Daxx and histone deacetylase II associate with chromatin through an interaction with core histones and the chromatin-associated protein Dek", *Journal of Cell Science*, 115 (Pt 16), 3319-3330.

Huang C., Melnick A., (2015), "Mechanisms of action of BCL6 during germinal center B cell development", *Science China Life Science*, 58 (12), 1226-1232.

Huang S. Y., Yao M., Tang J. L., Lee W. C., Tsay W., Cheng A. L., Wang C. H., Chen Y. C., Shen M. C., Tien H. F., (2007), "Epidemiology of multiple myeloma in Taiwan: increasing incidence for the past 25 years and higher prevalence of extramedullary myeloma in patients younger than 55 years", *Cancer*, 110 (4), 896-905.

Hurt E. M., Wiestner A., Rosenwald A., Shaffer A. L., Campo E., Grogan T., Bergsagel P. L., Kuehl W. M., Staudt L. M., (2004), "Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma", *Cancer Cell*, 5 (2), 191-199.

International Myeloma Working G., (2003), "Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group", *British Journal of Haematology*, 121 (5), 749-757.

Janssens S., Pulendran B., Lambrecht B. N., (2014), "Emerging functions of the unfolded protein response in immunity", *Nature Immunology*, 15 (10), 910-919.

Jung D., Giallourakis C., Mostoslavsky R., Alt F. W., (2006), "Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus", *Annual Review of Immunology*, 24 541-570.

Kalff A., Spencer A., (2012), "The t(4;14) translocation and FGFR3 overexpression in multiple myeloma: prognostic implications and current clinical strategies", *Blood Cancer Journal*, 2 e89.

Kallies A., Nutt S. L., (2010), "Bach2: plasma-cell differentiation takes a break", *EMBO Journal*, 29 (23), 3896-3897.

Kappes F., Burger K., Baack M., Fackelmayer F. O., Gruss C., (2001), "Subcellular localization of the human proto-oncogene protein DEK", *Journal of Biological Chemistry*, 276 (28), 26317-26323.

Kappes F., Damoc C., Knippers R., Przybylski M., Pinna L. A., Gruss C., (2004a), "Phosphorylation by Protein Kinase CK2 Changes the DNA Binding Properties of the Human Chromatin Protein DEK", *Molecular and Cellular Biology*, 24 (13), 6011-6020.

Kappes F., Fahrner J., Khodadoust M. S., Tabbert A., Strasser C., Mor-Vaknin N., Moreno-Villanueva M., Burkle A., Markovitz D. M., Ferrando-May E., (2008), "DEK is a poly(ADP-ribose) acceptor in apoptosis and mediates resistance to genotoxic stress", *Molecular and Cellular Biology*, 28 (10), 3245-3257.

Kappes F., Scholten I., Richter N., Gruss C., Waldmann T., (2004b), "Functional domains of the ubiquitous chromatin protein DEK", *Molecular and Cellular Biology*, 24 (13), 6000-6010.

Kappes F., Waldmann T., Mathew V., Yu J., Zhang L., Khodadoust M. S., Chinnaiyan A. M., Luger K., Erhardt S., Schneider R., Markovitz D. M., (2011), "The DEK oncoprotein is a Su(var) that is essential to heterochromatin integrity", *Genes & Development*, 25 (7), 673-678.

Karpova D., Bonig H., (2015), "Concise Review: CXCR4/CXCL12 Signaling in Immature Hematopoiesis--Lessons From Pharmacological and Genetic Models", *Stem Cells*, 33 (8), 2391-2399.

Kavanaugh G. M., Wise-Draper T. M., Morreale R. J., Morrison M. A., Gole B., Schwemberger S., Tichy E. D., Lu L., Babcock G. F., Wells J. M., Drissi R., Bissler J. J., Stambrook P. J., Andreassen P. R., Wiesmuller L., Wells S. I., (2011), "The human DEK oncogene regulates DNA damage response signaling and repair", *Nucleic Acids Research*, 39 (17), 7465-7476.

Khodadoust M. S., Verhaegen M., Kappes F., Riveiro-Falkenbach E., Cigudosa J. C., Kim D. S., Chinnaiyan A. M., Markovitz D. M., Soengas M. S., (2009), "Melanoma proliferation and chemoresistance controlled by the DEK oncogene", *Cancer Research*, 69 (16), 6405-6413.

Kim S. J., Shin H. T., Lee H. O., Kim N. K., Yun J. W., Hwang J. H., Kim K., Park W. Y., (2016), "Recurrent mutations of MAPK pathway genes in multiple myeloma but not in amyloid light-chain amyloidosis", *Oncotarget*, 7 (42), 68350-68359.

King C. L., Nutman T. B., (1993), "IgE and IgG subclass regulation by IL-4 and IFN-gamma in human helminth infections. Assessment by B cell precursor frequencies", *The Journal of Immunology*, 151 (1), 458-465.

Klein U., Dalla-Favera R., (2008), "Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy", *Nature Reviews Immunology*, 8 (1), 22-33.

Ko S. I., Lee I. S., Kim J. Y., Kim S. M., Kim D. W., Lee K. S., Woo K. M., Baek J. H., Choo J. K., Seo S. B., (2006), "Regulation of histone acetyltransferase activity of p300 and PCAF by proto-oncogene protein DEK", *FEBS Letters*, 580 (13), 3217-3222.

Koleva R. I., Ficarro S. B., Radomska H. S., Carrasco-Alfonso M. J., Alberta J. A., Webber J. T., Luckey C. J., Marcucci G., Tenen D. G., Marto J. A., (2012), "C/EBPalpha and DEK coordinately regulate myeloid differentiation", *Blood*, 119 (21), 4878-4888.

Krithivas A., Fujimuro M., Weidner M., Young D. B., Hayward S. D., (2002), "Protein interactions targeting the latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus to cell chromosomes", *Journal of Virology*, 76 (22), 11596-11604.

Kuczma M., Ding Z. C., Zhou G., (2016), "Immunostimulatory Effects of Melphalan and Usefulness in Adoptive Cell Therapy with Antitumor CD4⁺ T Cells", *Critical Reviews in Immunology*, 36 (2), 179-191.

Kuehl W. M., Bergsagel P. L., (2002), "Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions", *Nature Reviews Cancer*, 2 (3), 175-187.

Kumar S. K., Rajkumar V., Kyle R. A., van Duin M., Sonneveld P., Mateos M. V., Gay F., Anderson K. C., (2017), "Multiple myeloma", *Nature Reviews Disease Primers*, 3 17046.

Kuppers R., (2005), "Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis", *Nature Reviews Cancer*, 5 (4), 251-262.

Kyle R. A., Rajkumar S. V., (2008), "Multiple myeloma", *Blood*, 111 (6), 2962-2972.

Kyle R. A., Rajkumar S. V., (2009), "Treatment of multiple myeloma: a comprehensive review", *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 9 (4), 278-288.

Landgren O., Gridley G., Turesson I., Caporaso N. E., Goldin L. R., Baris D., Fears T. R., Hoover R. N., Linet M. S., (2006), "Risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and subsequent multiple myeloma among African American and white veterans in the United States", *Blood*, 107 (3), 904-906.

Landgren O., Morgan G. J., (2014), "Biologic frontiers in multiple myeloma: from biomarker identification to clinical practice", *Clinical Cancer Research*, 20 (4), 804-813.

LeBien T. W., Tedder T. F., (2008), "B lymphocytes: how they develop and function", *Blood*, 112 (5), 1570-1580.

Lee E. Y., Muller W. J., (2010), "Oncogenes and tumor suppressor genes", *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2 (10), a003236.

Leone P. E., Walker B. A., Jenner M. W., Chiecchio L., Dagrada G., Protheroe R. K., Johnson D. C., Dickens N. J., Brito J. L., Else M., Gonzalez D., Ross F. M., Chen-Kiang S., Davies F. E., Morgan G. J., (2008), "Deletions of CDKN2C in multiple myeloma: biological and clinical implications", *Clinical Cancer Research*, 14 (19), 6033-6041.

Li Z., Woo C. J., Iglesias-Ussel M. D., Ronai D., Scharff M. D., (2004), "The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination", *Genes & Development*, 18 (1), 1-11.

Lin L., Gerth A. J., Peng S. L., (2004), "Active inhibition of plasma cell development in resting B cells by microphthalmia-associated transcription factor", *The Journal of Experimental Medicine*, 200 (1), 115-122.

Lionetti M., Barbieri M., Todoerti K., Agnelli L., Marzorati S., Fabris S., Ciceri G., Galletti S., Milesi G., Manzoni M., Mazzoni M., Greco A., Tonon G., Musto P., Baldini L., Neri A., (2015), "Molecular spectrum of BRAF, NRAS and KRAS gene mutations in plasma cell dyscrasias: implication for MEK-ERK pathway activation", *Oncotarget*, 6 (27), 24205-24217.

Lode L., Eveillard M., Trichet V., Soussi T., Wulleme S., Richebourg S., Magrangeas F., Ifrah N., Campion L., Traulle C., Guilhot F., Caillot D., Marit G., Mathiot C., Facon T., Attal M., Harousseau J. L., Moreau P., Minvielle S., Avet-Loiseau H., (2010), "Mutations in TP53 are exclusively associated with del(17p) in multiple myeloma", *Haematologica*, 95 (11), 1973-1976.

Logan G. E., Mor-Vaknin N., Braunschweig T., Jost E., Schmidt P. V., Markovitz D. M., Mills K. I., Kappes F., Percy M. J., (2015), "DEK oncogene expression during normal hematopoiesis and in Acute Myeloid Leukemia (AML)", *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 54 (1), 123-131.

Lombard-Platet S., Meyer V., Ceredig R., (1997), "Both IFN-gamma and IL-4 induce MHC class II expression at the surface of mouse pro-B cells", *Developmental Immunology*, 5 (2), 115-120.

Luning Prak E. T., Monestier M., Eisenberg R. A., (2011), "B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1217 96-121.

MacLennan I. C., Toellner K. M., Cunningham A. F., Serre K., Sze D. M., Zuniga E., Cook M. C., Vinuesa C. G., (2003), "Extrafollicular antibody responses", *Immunological Reviews*, 194 8-18.

Maniatis A., (1998), "Pathophysiology of paraprotein production", *Renal Failure*, 20 (6), 821-828.

Martins G., Calame K., (2008), "Regulation and functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes", *Annual Review of Immunology*, 26 133-169.

Matrka M. C., Watanabe M., Muraleedharan R., Lambert P. F., Lane A. N., Romick-Rosendale L. E., Wells S. I., (2017), "Overexpression of the human DEK oncogene reprograms cellular metabolism and promotes glycolysis", *PLoS One*, 12 (5), e0177952.

Matsui W., Huff C. A., Wang Q., Malehorn M. T., Barber J., Tanhehco Y., Smith B. D., Civin C. I., Jones R. J., (2004), "Characterization of clonogenic multiple myeloma cells", *Blood*, 103 (6), 2332-2336.

Matsui W., Wang Q., Barber J. P., Brennan S., Smith B. D., Borrello I., McNiece I., Lin L., Ambinder R. F., Peacock C., Watkins D. N., Huff C. A., Jones R. J., (2008), "Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance", *Cancer Research*, 68 (1), 190-197.

McCarron M. J., Park P. W., Fooksman D. R., (2017), "CD138 mediates selection of mature plasma cells by regulating their survival", *Blood*, 129 (20), 2749-2759.

McHeyzer-Williams M. G., Ahmed R., (1999), "B cell memory and the long-lived plasma cell", *Current Opinion in Immunology*, 11 (2), 172-179.

Mesin L., Ersching J., Victora G. D., (2016), "Germinal Center B Cell Dynamics", *Immunity*, 45 (3), 471-482.

Miguel J. F. S., Schlag R., Khuageva N. K., Dimopoulos M. A., Shpilberg O., Kropff M., Spicka I., Petrucci M. T., Palumbo A., Samoilova O. S., Dmoszynska A., Abdulkadyrov K. M., Delforge M., Jiang B., Mateos M.-V., Anderson K. C., Esseltine D.-L., Liu K., Deraedt W., Cakana A., Velde H. v. d., Richardson P. G., (2013), "Persistent Overall Survival Benefit and No Increased Risk of Second Malignancies With Bortezomib-Melphalan-Prednisone Versus Melphalan-Prednisone in Patients With Previously Untreated Multiple Myeloma", *Journal of Clinical Oncology*, 31 (4), 448-455.

Millar B. C., Maitland J. A., Millar J. L., Bell J. B., (1989), "Melphalan transport into human malignant lymphoid cells differs from the murine equivalent in vitro", *British Journal of Cancer*, 59 (5), 710-713.

Mitchell M. E., Lowe K., Fryzek J., (2012), "A Multisource Approach to Improving Epidemiologic Estimates: Application to Global B-Cell Malignancies", *ISRN Oncology*, 2012 9.

Mittelman M., (2003), "The implications of anemia in multiple myeloma", *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 4 (supp 1) S23-29.

Moens L., Tangye S. G., (2014), "Cytokine-Mediated Regulation of Plasma Cell Generation: IL-21 Takes Center Stage", *Frontiers in Immunology*, 5 65.

Mogensen T. H., (2009), "Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses", *Clinical Microbiology Reviews*, 22 (2), 240-273.

Mor-Vaknin N., Punturieri A., Sitwala K., Faulkner N., Legendre M., Khodadoust M. S., Kappes F., Ruth J. H., Koch A., Glass D., Petruzzelli L., Adams B. S., Markovitz D. M., (2006), "The DEK nuclear autoantigen is a secreted chemotactic factor", *Molecular and Cellular Biology*, 26 (24), 9484-9496.

Morgan G. J., Kaiser M. F., (2012), "How to use new biology to guide therapy in multiple myeloma", *Hematology American Society of Hematology Education Program*, 2012 342-349.

Morgan G. J., Walker B. A., Davies F. E., (2012), "The genetic architecture of multiple myeloma", *Nature Reviews Cancer*, 12 (5), 335-348.

Munshi N. C., Avet-Loiseau H., (2011), "Genomics in multiple myeloma", *Clinical Cancer Research*, 17 (6), 1234-1242.

Murphy K. P., Murphy K. M., Travers P., Walport M., Janeway C., Mauri C., Ehrenstein M., (2008), "Janeway's Immunobiology", 7th edition, Garland Science.

Nagasawa T., (2006), "Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development", *Nature Reviews Immunology*, 6 (2), 107-116.

Naradikian M. S., Scholz J. L., Oropallo M. A., Cancro M. P. (2014). Understanding B Cell Biology. In *Drugs Targeting B-Cells in Autoimmune Diseases*, Bosch X., Ramos-Casals M., Khamashta M. A., editors, Springer.

Nera K. P., Lassila O., (2006), "Pax5--a critical inhibitor of plasma cell fate", *Scandinavian Journal of Immunology*, 64 (3), 190-199.

Nutt S. L., Hodgkin P. D., Tarlinton D. M., Corcoran L. M., (2015), "The generation of antibody-secreting plasma cells", *Nature Reviews Immunology*, 15 (3), 160-171.

Nutt S. L., Taubenheim N., Hasbold J., Corcoran L. M., Hodgkin P. D., (2011), "The genetic network controlling plasma cell differentiation", *Seminars in Immunology*, 23 (5), 341-349.

O'Connell F. P., Pinkus J. L., Pinkus G. S., (2004), "CD138 (syndecan-1), a plasma cell marker immunohistochemical profile in hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms", *American Journal of Clinical Pathology*, 121 (2), 254-263.

Ochiai K., Maienschein-Cline M., Simonetti G., Chen J., Rosenthal R., Brink R., Chong A. S., Klein U., Dinner A. R., Singh H., Sciammas R., (2013), "Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of IRF4", *Immunity*, 38 (5), 918-929.

Ondrejka S. L., Hsi E. D., (2015), "Pathology of B-cell lymphomas: diagnosis and biomarker discovery", *Cancer Treatment and Research*, 165 27-50.

Oracki S. A., Walker J. A., Hibbs M. L., Corcoran L. M., Tarlinton D. M., (2010), "Plasma cell development and survival", *Immunol Reviews*, 237 (1), 140-159.

Oyajobi B. O., (2007), "Multiple myeloma/hypercalcemia", *Arthritis Research & Therapy*, 9 (supp 1) S4.

Özdilek A., (2013), "Multiple miyelom hastalarında DEK proteininin analizi", Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü.

Paino T., Sarasquete M. E., Paiva B., Krzeminski P., San-Segundo L., Corchete L. A., Redondo A., Garayoa M., Garcia-Sanz R., Gutierrez N. C., Ocio E. M., San-Miguel J. F., (2014), "Phenotypic, genomic and functional characterization reveals no differences between CD138⁺⁺ and CD138^{low} subpopulations in multiple myeloma cell lines", *PLoS One*, 9 (3), e92378.

Palanichamy A., Barnard J., Zheng B., Owen T., Quach T., Wei C., Looney R. J., Sanz I., Anolik J. H., (2009), "Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy", *Journal of Immunology*, 182 (10), 5982-5993.

Papadopoulou E. C., Batzios S. P., Dimitriadou M., Perifanis V., Garipidou V., (2010), "Multiple myeloma and bone disease: pathogenesis and current therapeutic approaches", *Hippokratia*, 14 (2), 76-81.

Papavasiliou F. N., Schatz D. G., (2002), "The activation-induced deaminase functions in a postcleavage step of the somatic hypermutation process", *Journal Experimental Medicine*, 195 (9), 1193-1198.

Parker N., Schneegurt M., Tu A. H. T., Lister P., Forster B. M., (2016), "Microbiology", OpenStax College, Rice University.

Pawig L., Klasen C., Weber C., Bernhagen J., Noels H., (2015), "Diversity and Inter-Connections in the CXCR4 Chemokine Receptor/Ligand Family: Molecular Perspectives", *Frontiers in Immunology*, 6 429.

Pease N. A., Wise-Draper T., Privette Vinnedge L., (2015), "Dissecting the Potential Interplay of DEK Functions in Inflammation and Cancer", *Journal of Oncology*, 2015 106517.

Pecina-Slaus N., (2003), "Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells", *Cancer Cell International*, 3 (1), 17.

Pieper K., Grimbacher B., Eibel H., (2013), "B-cell biology and development", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131 (4), 959-971.

Pillai S., Cariappa A., (2009), "The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision", *Nature Reviews Immunology*, 9 (11), 767-777.

Pillai S., Mattoo H., Cariappa A., (2011), "B cells and autoimmunity", *Current Opinion in Immunology*, 23 (6), 721-731.

Pokharel M., (2012), "Leukemia : A Review Article", *IJARPB*, 2 (3), 397-407.

Polavarapu A., Stillabower J. A., Stubblefield S. G., Taylor W. M., Baik M. H., (2012), "The mechanism of guanine alkylation by nitrogen mustards: a computational study", *The Journal of Organic Chemistry*, 77 (14), 5914-5921.

Pone E. J., Xu Z., White C. A., Zan H., Casali P., (2012), "B cell TLRs and induction of immunoglobulin class-switch DNA recombination", *Frontiers in Bioscience (Landmark Ed)*, 17 2594-2615.

Porse B. T., Bryder D., Theilgaard-Monch K., Hasemann M. S., Anderson K., Damgaard I., Jacobsen S. E., Nerlov C., (2005), "Loss of C/EBP alpha cell cycle control increases myeloid progenitor proliferation and transforms the neutrophil granulocyte lineage", *Journal of Experimental Medicine*, 202 (1), 85-96.

Potapova T. A., Zhu J., Li R., (2013), "Aneuploidy and chromosomal instability: a vicious cycle driving cellular evolution and cancer genome chaos", *Cancer and Metastasis Reviews*, 32 (3-4), 377-389.

Pratt G., (2002), "Molecular aspects of multiple myeloma", *Molecular Pathology*, 55 (5), 273-283.

Pridans C., Holmes M. L., Polli M., Wettenhall J. M., Dakic A., Corcoran L. M., Smyth G. K., Nutt S. L., (2008), "Identification of Pax5 target genes in early B cell differentiation", *Journal of Immunology*, 180 (3), 1719-1728.

Privette Vinnedge L. M., Benight N. M., Wagh P. K., Pease N. A., Nashu M. A., Serrano-Lopez J., Adams A. K., Cancelas J. A., Waltz S. E., Wells S. I., (2015), "The DEK oncogene promotes cellular proliferation through paracrine Wnt signaling in Ron receptor-positive breast cancers", *Oncogene*, 34 (18), 2325-2336.

Privette Vinnedge L. M., McClaine R., Wagh P. K., Wikenheiser-Brokamp K. A., Waltz S. E., Wells S. I., (2011), "The human DEK oncogene stimulates beta-catenin signaling, invasion and mammosphere formation in breast cancer", *Oncogene*, 30 (24), 2741-2752.

Raab M. S., Podar K., Breitkreutz I., Richardson P. G., Anderson K. C., (2009), "Multiple myeloma", *Lancet*, 374 (9686), 324-339.

Rajan A. M., Rajkumar S. V., (2015), "Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice", *Blood Cancer Journal*, 5 e365.

Rajkumar S. V., Harousseau J. L., (2016), "Next-generation multiple myeloma treatment: a pharmacoeconomic perspective", *Blood*, 128 (24), 2757-2764.

Ratliff M. L., Templeton T. D., Ward J. M., Webb C. F., (2014), "The Bright Side of Hematopoiesis: Regulatory Roles of ARID3a/Bright in Human and Mouse Hematopoiesis", *Frontiers in Immunology*, 5 113.

Recaladin T., Fear D. J., (2016), "Transcription factors regulating B cell fate in the germinal centre", *Clin Exp Immunol*, 183 (1), 65-75.

Ribourtout B., Zandecki M., (2015), "Plasma cell morphology in multiple myeloma and related disorders", *Morphologie*, 99 (325), 38-62.

Richardson P., Laubach J., Mahindra A., Mitsiades C., Schlossman R., Ghobrial I., Hideshima T., Raje N., Munshi N., Anderson K., (2010), "The treatment of multiple

myeloma patients not eligible for asct", *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Disease*, 2 (2), e2010009.

Riveiro-Falkenbach E., Soengas M. S., (2010), "Control of tumorigenesis and chemoresistance by the DEK oncogene", *Clinical Cancer Research*, 16 (11), 2932-2938.

Robillard N., Willeme S., Moreau P., Bene M. C., (2014), "Immunophenotype of normal and myelomatous plasma-cell subsets", *Frontiers in Immunology*, 5 137.

Rossi D., Cerri M., Capello D., Deambrogi C., Berra E., Franceschetti S., Alabiso O., Glohini A., Paulli M., Carbone A., Pileri S. A., Pasqualucci L., Gaidano G., (2005), "Aberrant somatic hypermutation in primary mediastinal large B-cell lymphoma", *Leukemia*, 19 (12), 2363-2366.

Rush J. S., Hodgkin P. D., (2001), "B cells activated via CD40 and IL-4 undergo a division burst but require continued stimulation to maintain division, survival and differentiation", *European Journal of Immunology*, 31 (4), 1150-1159.

Saha A. K., Kappes F., Mundade A., Deutzmann A., Rosmarin D. M., Legendre M., Chatain N., Al-Obaidi Z., Adams B. S., Ploegh H. L., Ferrando-May E., Mor-Vaknin N., Markovitz D. M., (2013), "Intercellular trafficking of the nuclear oncoprotein DEK", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 110 (17), 6847-6852.

Sanden C., Gullberg U., (2015), "The DEK oncoprotein and its emerging roles in gene regulation", *Leukemia*, 29 (8), 1632-1636.

Sanden C., Jarvstrat L., Lennartsson A., Brattas P. L., Nilsson B., Gullberg U., (2014), "The DEK oncoprotein binds to highly and ubiquitously expressed genes with a dual role in their transcriptional regulation", *Molecular Cancer*, 13 215.

Sansing H. A., Sarkeshik A., Yates J. R., Patel V., Gutkind J. S., Yamada K. M., Berrier A. L., (2011), "Integrin α 5 β 1, α 5 β 1, α 6 β 1 effectors p130Cas, Src and talin regulate carcinoma invasion and chemoresistance", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 406 (2), 171-176.

Sawatsubashi S., Murata T., Lim J., Fujiki R., Ito S., Suzuki E., Tanabe M., Zhao Y., Kimura S., Fujiyama S., Ueda T., Umetsu D., Ito T., Takeyama K., Kato S., (2010), "A histone chaperone, DEK, transcriptionally coactivates a nuclear receptor", *Genes & Development*, 24 (2), 159-170.

Seifert M., Scholtysik R., Kuppers R., (2013), "Origin and pathogenesis of B cell lymphomas", *Methods in Molecular Biology*, 971 1-25.

Seita J., Weissman I. L., (2010), "Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation", *Wiley Interdisciplinary Reviews: System Biology and Medicine*, 2 (6), 640-653.

Shaffer A. L., Lin K. I., Kuo T. C., Yu X., Hurt E. M., Rosenwald A., Giltnane J. M., Yang L., Zhao H., Calame K., Staudt L. M., (2002), "Blimp-1 orchestrates plasma

cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program", *Immunity*, 17 (1), 51-62.

Shapiro-Shelef M., Calame K., (2005), "Regulation of plasma-cell development", *Nature Reviews Immunology*, 5 (3), 230-242.

Shibata T., Kokubu A., Miyamoto M., Hosoda F., Gotoh M., Tsuta K., Asamura H., Matsuno Y., Kondo T., Imoto I., Inazawa J., Hirohashi S., (2010), "DEK oncoprotein regulates transcriptional modifiers and sustains tumor initiation activity in high-grade neuroendocrine carcinoma of the lung", *Oncogene*, 29 (33), 4671-4681.

Shlien A., Malkin D., (2009), "Copy number variations and cancer", *Genome Medicine*, 1 (6), 62.

Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A., (2018), "Cancer statistics, 2018", *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68 (1), 7-30.

Sitwala K. V., Adams K., Markovitz D. M., (2002), "YY1 and NF-Y binding sites regulate the transcriptional activity of the dek and dek-can promoter", *Oncogene*, 21 (57), 8862-8870.

Smetana J., Frohlich J., Zaoralova R., Vallova V., Greslikova H., Kupska R., Nemec P., Mikulasova A., Almasi M., Pour L., Adam Z., Sandecka V., Zahradova L., Hajek R., Kuglik P., (2014), "Genome-wide screening of cytogenetic abnormalities in multiple myeloma patients using array-CGH technique: a Czech multicenter experience", *Biomed Research International*, 2014 209670.

Smith C., (2003), "Hematopoietic stem cells and hematopoiesis", *Cancer Control*, 10 (1), 9-16.

Smith E. A., Gole B., Willis N. A., Soria R., Starnes L. M., Krumpelbeck E. F., Jegga A. G., Ali A. M., Guo H., Meetei A. R., Andreassen P. R., Kappes F., Vinnedge L. M., Daniel J. A., Scully R., Wiesmuller L., Wells S. I., (2017), "DEK is required for homologous recombination repair of DNA breaks", *Scientific Reports*, 7 44662.

Soares L. M., Zanier K., Mackereth C., Sattler M., Valcarcel J., (2006), "Intron removal requires proofreading of U2AF/3' splice site recognition by DEK", *Science*, 312 (5782), 1961-1965.

Stark G. R., Kerr I. M., Williams B. R., Silverman R. H., Schreiber R. D., (1998), "How cells respond to interferons", *Annual Review of Biochemistry*, 67 227-264.

Stavnezer J., Guikema J. E., Schrader C. E., (2008), "Mechanism and regulation of class switch recombination", *Annual Review Immunology*, 26 261-292.

Stavnezer J., Schrader C. E., (2014), "IgH chain class switch recombination: mechanism and regulation", *The Journal of Immunology*, 193 (11), 5370-5378.

Szatmari T., Dobra K., (2013), "The role of syndecan-1 in cellular signaling and its effects on heparan sulfate biosynthesis in mesenchymal tumors", *Frontiers in Oncology*, 3 310.

Tadmori W., Lee H. K., Clark S. C., Choi Y. S., (1989), "Human B cell proliferation in response to IL-4 is associated with enhanced production of B cell-derived growth factors", *Journal of Immunology*, 142 (3), 826-832.

Taylor J., Xiao W., Abdel-Wahab O., (2017), "Diagnosis and classification of hematologic malignancies on the basis of genetics", *Blood*, 130 (4), 410-423.

Tellier J., Kallies A., (2014), "Finding a home for plasma cells--a niche to survive", *European Journal of Immunology*, 44 (8), 2243-2246.

Tellier J., Shi W., Minnich M., Liao Y., Crawford S., Smyth G. K., Kallies A., Busslinger M., Nutt S. L., (2016), "Blimp-1 controls plasma cell function through the regulation of immunoglobulin secretion and the unfolded protein response", *Nature Immunology*, 17 (3), 323-330.

Terstappen L. W., Johnsen S., Segers-Nolten I. M., Loken M. R., (1990), "Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry", *Blood*, 76 (9), 1739-1747.

Therneau T. M., Kyle R. A., Melton L. J., Larson D. R., Benson J. T., Colby C. L., Dispenzieri A., Kumar S., Katzmann J. A., Cerhan J. R., Rajkumar S. V., (2012), "Incidence of monoclonal gammopathy of undetermined significance and estimation of duration before first clinical recognition", *Mayo Clinic Proceedings*, 87 (11), 1071-1079.

Todd D. J., Lee A. H., Glimcher L. H., (2008), "The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity", *Nature Reviews Immunology*, 8 (9), 663-674.

Treanor B., (2012), "B-cell receptor: from resting state to activate", *Immunology*, 136 (1), 21-27.

Turesson I., Velez R., Kristinsson S. Y., Landgren O., (2010), "Patterns of improved survival in patients with multiple myeloma in the twenty-first century: a population-based study", *Journal of Clinical Oncology*, 28 (5), 830-834.

Uckun F. M., (1990), "Regulation of human B-cell ontogeny", *Blood*, 76 (10), 1908-1923.

van de Donk N. W., Mutis T., Poddighe P. J., Lokhorst H. M., Zweegman S., (2016), "Diagnosis, risk stratification and management of monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma", *International Journal of Laboratory Hematology*, 38 Suppl 1 110-122.

Van Snick J., (1990), "Interleukin-6: an overview", *Annual Review of Immunology*, 8 253-278.

Vazquez M. I., Catalan-Dibene J., Zlotnik A., (2015), "B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment", *Cytokine*, 74 (2), 318-326.

Vettermann C., Schlissel M. S., (2010), "Allelic exclusion of immunoglobulin genes: models and mechanisms", *Immunological Reviews*, 237 (1), 22-42.

von Lindern M., Fornerod M., van Baal S., Jaegle M., de Wit T., Buijs A., Grosveld G., (1992), "The translocation (6;9), associated with a specific subtype of acute myeloid leukemia, results in the fusion of two genes, *dek* and *can*, and the expression of a chimeric, leukemia-specific *dek-can* mRNA", *Molecular and Cellular Biology*, 12 (4), 1687-1697.

Wadhera R. K., Rajkumar S. V., (2010), "Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance: a systematic review", *Mayo Clinic Proceedings*, 85 (10), 933-942.

Waldmann T., Baack M., Richter N., Gruss C., (2003), "Structure-specific binding of the proto-oncogene protein DEK to DNA", *Nucleic Acids Research*, 31 (23), 7003-7010.

Waldmann T., Eckerich C., Baack M., Gruss C., (2002), "The ubiquitous chromatin protein DEK alters the structure of DNA by introducing positive supercoils", *Journal of Biological Chemistry*, 277 (28), 24988-24994.

Waldmann T., Scholten I., Kappes F., Hu H. G., Knippers R., (2004), "The DEK protein--an abundant and ubiquitous constituent of mammalian chromatin", *Gene*, 343 (1), 1-9.

Walker B. A., Leone P. E., Chiecchio L., Dickens N. J., Jenner M. W., Boyd K. D., Johnson D. C., Gonzalez D., Dagrada G. P., Protheroe R. K., Konn Z. J., Stockley D. M., Gregory W. M., Davies F. E., Ross F. M., Morgan G. J., (2010), "A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value", *Blood*, 116 (15), e56-65.

Wang H., Clarke S. H., (2007), "Association of the pre-B cell receptor (BCR) expression level with the quality of pre-BII cell differentiation reveals hierarchical pre-BCR function", *Molecular Immunology*, 44 (7), 1765-1774.

Warr M. R., Pietras E. M., Passegue E., (2011), "Mechanisms controlling hematopoietic stem cell functions during normal hematopoiesis and hematological malignancies", *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 3 (6), 681-701.

Waxman A. J., Mink P. J., Devesa S. S., Anderson W. F., Weiss B. M., Kristinsson S. Y., McGlynn K. A., Landgren O., (2010), "Racial disparities in incidence and outcome in multiple myeloma: a population-based study", *Blood*, 116 (25), 5501-5506.

Web 1, (2018), https://en.wikipedia.org/wiki/B_cell , (Erişim Tarihi: 24/09/2018).

Web 2, (2018), <https://www.myeloma.org/multiple-myeloma-drugs> , (Erişim Tarihi: 24/09/2018).

Web 3, (2018), <http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lisr/literature/10020688.pdf>, (Erişim Tarihi: 24/09/2018)

Web 4, (2015), http://www.doubling-time.com/compute_more.php , (Erişim Tarihi: 17/12/2015).

Weissbach S., Langer C., Puppe B., Nedeva T., Bach E., Kull M., Bargou R., Einsele H., Rosenwald A., Knop S., Leich E., (2015), "The molecular spectrum and clinical impact of DIS3 mutations in multiple myeloma", *British Journal of Haematology*, 169 (1), 57-70.

Wise-Draper T. M., Allen H. V., Jones E. E., Habash K. B., Matsuo H., Wells S. I., (2006), "Apoptosis inhibition by the human DEK oncoprotein involves interference with p53 functions", *Molecular and Cellular Biology*, 26 (20), 7506-7519.

Wise-Draper T. M., Allen H. V., Thobe M. N., Jones E. E., Habash K. B., Munger K., Wells S. I., (2005), "The human DEK proto-oncogene is a senescence inhibitor and an upregulated target of high-risk human papillomavirus E7", *Journal of Virology*, 79 (22), 14309-14317.

Wise-Draper T. M., Mintz-Cole R. A., Morris T. A., Simpson D. S., Wikenheiser-Brokamp K. A., Currier M. A., Cripe T. P., Grosveld G. C., Wells S. I., (2009), "Overexpression of the cellular DEK protein promotes epithelial transformation in vitro and in vivo", *Cancer Research*, 69 (5), 1792-1799.

Withrow J., Murphy C., Liu Y., Hunter M., Fulzele S., Hamrick M. W., (2016), "Extracellular vesicles in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and osteoarthritis", *Arthritis Research & Therapy*, 18 (1), 286.

Xie J., Zhang L., Li M., Du J., Zhou L., Yang S., Zeng L., Li Z., Wang G., Wang D., (2014), "Functional analysis of the involvement of apurinic/aprimidinic endonuclease 1 in the resistance to melphalan in multiple myeloma", *BMC Cancer*, 14 11.

Yu L., Huang X., Zhang W., Zhao H., Wu G., Lv F., Shi L., Teng Y., (2016), "Critical role of DEK and its regulation in tumorigenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma", *Oncotarget*, 7 (18), 26844-26855.

Zhang J. M., An J., (2007), "Cytokines, inflammation, and pain", *International Anesthesiology Clinics*, 45 (2), 27-37.

Zhang M., Srivastava G., Lu L., (2004), "The pre-B cell receptor and its function during B cell development", *Cellular and Molecular Immunology*, 1 (2), 89-94.

Zhang Y., Garcia-Ibanez L., Toellner K. M., (2016), "Regulation of germinal center B-cell differentiation", *Immunological Reviews*, 270 (1), 8-19.

Zhu Y. X., Shi C. X., Bruins L. A., Jedlowski P., Wang X., Kortum K. M., Luo M., Ahmann J. M., Braggio E., Stewart A. K., (2017), "Loss of FAM46C Promotes Cell Survival in Myeloma", *Cancer Research*, 77 (16), 4317-4327.

Zingone A., Kuehl W. M., (2011), "Pathogenesis of monoclonal gammopathy of undetermined significance and progression to multiple myeloma", *Seminars in Hematology*, 48 (1), 4-12.

Zojer N., Konigsberg R., Ackermann J., Fritz E., Dallinger S., Kromer E., Kaufmann H., Riedl L., Gisslinger H., Schreiber S., Heinz R., Ludwig H., Huber H., Drach J., (2000), "Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization", *Blood*, 95 (6), 1925-1930.

Zong F., Fthenou E., Mundt F., Szatmari T., Kovalszky I., Szilak L., Brodin D., Tzanakakis G., Hjerpe A., Dobra K., (2011), "Specific syndecan-1 domains regulate mesenchymal tumor cell adhesion, motility and migration", *PLoS One*, 6 (6), e14816.

Zweegman S., Palumbo A., Bringhen S., Sonneveld P., (2014), "Age and aging in blood disorders: multiple myeloma", *Haematologica*, 99 (7), 1133-1137.

ÖZGEÇMİŞ

Z. Onur ÇALIŞKANER 1987 yılında İstanbul'da doğdu. 2005 yılında başladığı İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji ve 2006 yılında başladığı Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümlerinden (çift anadal) eş zamanlı olarak 2009 yılında mezun oldu. Aynı yıl Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında başladığı yüksek lisans eğitimini 2013 yılında tamamlayarak Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında doktora programına başladı. Yüksek Lisans eğitiminden itibaren farklı BAP ve TÜBİTAK projelerinde Yardımcı Araştırmacı ve Proje Bursiyeri olarak görev alan ÇALIŞKANER, 2011 yılından bu yana aynı anabilim dalında Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.

EKLER

Ek A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Caliskaner Z. O., Cakar T., Ozcelik E., Ozdilek A., Kim A. S., Dogan O., Bosompem A., Grosveld G., Saka B., Kandilci A., (2017), “DEK protein level is a biomarker of CD138positive normal and malignant plasma cells”, PLoS One 12, e0178025.

Çalışkaner Z. O., Kandilci A., (2016), “Investigating Potential Affects of Dek Expression on Multiple Myeloma Cells”, GTÜ Fen Bilimleri Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu, Gebze, Kocaeli-Türkiye, 17-18 Mayıs. (Sözlü Sunum)

Çalışkaner Z. O.*, Özçelik E.*, Kandilci A., (2015), "Endojen DEK İfadesindeki Baskılanmanın Multiple Miyelom Hücre Hatlarının Temel Biyolojik Özellikleri Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması", XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası katılımlı), Fethiye-Türkiye, 27-30 Ekim. *Eşit Katkı

Ek B: Telif Hakkı Bulunan Materyaller İçin Alınan İzinler

Tablo B1.1: Telif hakkı bulunan şekiller için alınan izinler.

Şekil No	Lisans Tarihi	Lisans No	Telif Sahibi
3.1	17.10.2018	4451530253835	Springer Nature
4.1	17.10.2018	4451540988972	Springer Nature
4.2	17.10.2018	4451541270928	Elsevier
4.3	17.10.2018	4451541270928	Elsevier
4.4	17.10.2018	4451550324478	Springer Nature
4.5	17.10.2018	4451550018589	Springer Nature
4.7	17.10.2018	4451550324478	Springer Nature
4.8	17.10.2018	4451550696876	Elsevier
4.10	17.10.2018	4451550984902	American Association for Cancer Research
5.1	17.10.2018	4451551191442	Springer Nature
5.3	17.10.2018	4451570026019	Springer Nature
6.1	17.10.2018	4451570398593	Elsevier
6.2	17.10.2018	4451570585813	American Association for Cancer Research