

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MULTİPLE MİYELOMA HASTALARINDA DEK GENİNİN
KOPYA SAYISI VE EKSPRESYON SEVİYESİNİN
BELİRLENMESİ

TÜRKAN ÇAKAR
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2014

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MULTİPLE MİYELOMA HASTALARINDA
DEK GENİNİN KOPYA SAYISI VE
EKSPRESYON SEVİYESİNİN
BELİRLENMESİ

TÜRKAN ÇAKAR
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
DOÇ. DR. AYTEN KANDİLCİ

GEBZE
2014



**GEBZE YÜKSEK
TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 23.06.2014 tarih ve 2014/37 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 11/07/2014 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Türkan ÇAKAR' ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Ayten KANDİLCİ

ÜYE

: Prof. Dr. Tamer YAĞCI

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Tunahan ÇAKIR

ONAY

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Multiple miyeloma (MM) olgun B hücrelerinin klonal çoğalmasıyla ortaya çıkan bir kanser türüdür. Hematolojik kanserlerin %10'unu, tüm kanser türlerinin %1'ini MM oluşturmaktadır. MM hastalarının %20'sinde, DEK geninin bulunduğu kromozom 6p22.3 bölgesinde kopya sayısı artışı olduğu tespit edilmiştir, ancak bu artışın DEK genini etkileyip etkilemediği bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında, MM'de sıklıkla hasara uğrayan kromozom 6p22.3 bölgesinde yerleşim gösteren aday genlerden biri olan DEK'in ekspresyon seviyesinin ve kopya sayısının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla, MM hastalarının parafin blok veya dondurulmuş/taze kemik iliği örneklerinde DEK mRNA ekspresyonu RT-qPCR yöntemi ile incelendi. Analiz sonucunda, sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MM hastalarında *DEK* mRNA ekspresyonunun anlamlı oranda azaldığı tespit edildi. Ayrıca, 41 MM hastasının 4'ünde DEK geninin kopya sayısında, kontrol kemik iliğine göre 1.5 kat (3 kopya) veya üzerinde artış olduğu, ancak kopya sayısındaki artışın, aynı hücrelerdeki DEK mRNA ekspresyonunu etkilemediği gösterildi. Kopya sayısındaki artışın, MM hastalarının sadece kanserli hücrelerine özgün olduğu ve bu hastaların kanserli olmayan hücrelerinde DEK'in iki kopya halinde bulunduğu tespit edildi. Son olarak, MM hastalarının parafin blok kesitleri, DEK ve CD138 antikorlarıyla immunohistokimyasal (İHK) yöntemle incelendi ve CD138 pozitif olan normal plazma hücrelerinin ve MM hücrelerinin bu yöntemle tespit edilebilecek düzeyde DEK proteini eksprese etmediği gösterildi.

Özetle, elde ettiğimiz sonuçlar, DEK mRNA ekspresyonunun, DEK geni kopya sayısından bağımsız olarak, normal plazma hücrelerinde ve MM hücrelerinde azaldığını ve DEK'in MM'nin ayırıcı tanısında negatif bir immünohistokimyasal belirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Multiple Miyeloma, DEK, CD138, Plazma Hücresi, İmmunohistokimya.

SUMMARY

Multiple Myeloma (MM) is a cancer of plasma cells in which about 20% of patients carry increased copy number in chromosome 6p22.3. Although the *DEK* gene is localized to the chromosome 6p22.3 region, it is not known whether its copy number and expression is affected in MM patients. In this thesis, we aimed to determine the expression and copy number of DEK gene in MM patients.

We analyzed the expression of DEK mRNA in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) or fresh/frozen bone marrow tissues of MM patients using RT-qPCR. Our results showed that DEK mRNA was significantly downregulated in MM patients compared to the healthy controls. Additionally, although the copy number of the DEK gene was increased in 4 out of 41 MM patients, this increase was not reflected in the DEK mRNA expression. Immunohistochemical analysis of FFPE samples of MM patients and healthy controls indicated that DEK is widely expressed in myeloid and erithroid series. However, there was not detectable DEK protein neither in normal nor in myeloma cells.

In summary, our results showed that, regardless of the copy number of the gene, DEK mRNA expression is downregulated in both normal and malignant (MM) plasma cells. Lack of detectable DEK protein in MM cells might be a useful negative immunohistochemical marker for the differential diagnosis of MM.

Keywords: Multiple Myeloma, DEK, CD138, Plasma Cell, Immunohistochemistry.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince ve bu tez çalışmasının bütün aşamalarında göstermiş olduğu büyük destek ve özverisinden dolayı değerli hocam Doç. Dr. Ayten KANDİLCİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezim için gerekli hasta örneklerinin sağlanmasındaki katkılarının yanı sıra bilgi ve tecrübelerini de bizden esirgemeyen İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Öner DOĞAN'a ve Vanderbilt Üniversitesi, Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Annette S. Kim'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince göstermiş oldukları desteklerinden dolayı laboratuvar arkadaşlarım Ahmet Özdilek, Onur Çalışkaner, Emrah Özçelik'e ve her anlamda yanımda olan Elif Teke, Duygu Dede, Duygu Koca, Fatma Sağır, Şeyma Özen, Özge Arslan ve Görkem Odabaş'a teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen annem başta olmak üzere değerli aileme şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLOLAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. HEMATOPOETİK SİSTEM	2
3. B LENFOSİTLERİ	4
3.1. B Lenfositlerin Gelişimi	4
3.2. Gen Segment Değişimleri	5
3.3. Self Reaktif B Hücrelerin Klonal Silinimi	6
3.4 B Hücre Aktivasyonu	6
4. PLAZMA HÜCRELERİ	8
4.1. Plazma Hücre Gelişimi	8
4.2. Plazma Hücre Gelişiminde Rol Alan Transkripsiyon Faktörleri	9
4.3. Plazma Hücre Gelişimi ve Hematopoetik Kanserler	11
5. MULTİPLE MİYELOM	12
5.1. Hastalık ve Belirtileri	12
5.2. Hastalığın Seviyelendirilmesi	13
5.3. Multiple Miyelomun Oluşma Sebepleri ve Tedavisi	15
6. DEK	18
6.1. DEK Geninin Karakterizasyonu	18
6.2. DEK' in Yapısal Özellikleri ve Hücresel Fonksiyonları	18
6.3. DEK Proteininin Tümör Oluşumundaki Rolü	19
6.4. DEK Geni ve Multiple Miyeloma	20
7. MATERYAL	21
7.1. Biyolojik Materyaller	21

7.1.1. Paraffin Blok Örnekleri	21
7.1.2. Taze Kemik İliği Doku Örnekleri	21
7.2. Kimyasallar ve Cihazlar	22
8. YÖNTEM	25
8.1. DEK ve CD138 Antikorlarıyla İkili İmmünohistokimyasal Boyama	25
8.1.1. Deparafinizasyon ve Hidrasyon	25
8.1.2. Antijenlerin Açığa Çıkarılması (Antigen Retrieval)	25
8.1.3. CD138 ve DEK Antikorları ile İkili Boyama	25
8.1.4. Hematoksilen Boyaması	26
8.1.5. Dehidrasyon ve Kapama	26
8.2. CD138 Pozitif ve Negatif Kemik İliği Hücrelerinin İzolasyonu	27
8.2.1. Kemik İliği Hücrelerinden Eritrositlerin Uzaklaştırılması	27
8.2.2. EasySep Yöntemi ile Hücrelerin Ayırıştırılması	27
8.3. Taze Hücrelerin Sıvı Azotta Saklanması	28
8.4. RT-qPCR	29
8.4.1. RNA İzolasyonu	29
8.4.1.1. Parafin Blok Örneklerinden Total RNA İzolasyonu	29
8.4.1.2. Taze veya Dondurulmuş Kemik İliği Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu	29
8.4.2. cDNA Sentezi	29
8.4.3. RT-qPCR Yöntemi	30
8.5. qPCR	31
8.5.1. DNA İzolasyonu	31
8.5.2. qPCR Yöntemi ile DEK Geninin Kopya Sayısının Belirlenmesi	31
8.6. İstatistiksel Analiz	32
9. BULGULAR	33
9.1. Parafin Blok Örneklerinde DEK mRNA Ekspresyonunun Belirlenmesi	33
9.2. Taze veya Dondurulmuş Kemik İliği Hücrelerinden Ayırıştırılan CD138 ^{pozitif} ve CD138 ^{negatif} Hücrelerdeki DEK Ekspresyonu ve DEK Geni Kopya Sayısının Belirlenmesi	41
9.2.1. CD138 ^{pozitif} ve CD138 ^{negatif} Hücrelerin Ayırıştırılması	41
9.2.2. CD138 ^{pozitif} ve CD138 ^{negatif} MM Hücrelerinde DEK	43

Ekspresyon Seviyesinin mRNA Düzeyinde Belirlenmesi	
9.3. MM Hastalarında DEK Geni Kopya Sayısının Belirlenmesi	45
9.4. DEK Ekspresyon Seviyesinin İmmunohistokimyasal Yöntemle	48
Protein Düzeyinde Tespit Edilmesi	
10. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	57
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	66
EKLER	67

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Açıklamalar

Kısaltmalar

ABL1	: Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
ACTB	: Actin-beta
ALP	: Alkalın fosfataz
AML	: Akut miyeloid lösemi
BCL6	: B-cell lymphoma 6
BL	: Burkitt lenfoma
BLIMP-1	: B lymphocyte-induced maturation protein 1
CDKN2C	: Cyclin-dependent kinase inhibitor 2C
cDNA	: Complementary DNA
CLP	: Ortak lenfosit projenitör
cm	: Santimetre
Cr	: Kreatin
CXCL12	: C-X-C motif chemokine 12
CXCR4	: C-X-C chemokine receptor type 4
D	: Diversity
DAB	: 3,3'Diaminobenzidine
dL	: Desilitre
DLBCL	: Diffüz büyük hücreli B Lenfoma
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ER	: Endoplazmik Retikulum
FACS	: Fluorescence-activated cell sorting
FAM46C	: Family with sequence similarity 46, member C
FBS	: Fetal Bovine Serum
FGFR3	: Fibroblast büyüme faktör reseptörü 3
FISH	: Florasan in situ hibridizasyonu
FLT3	: FMS benzeri tirozin kinaz 3
GM	: Germinal merkezi.

GMP	: Granülosit/makrofaj projenitör
H&E	: Hematoksilen ve Eozin
HKH	: Hematopoetik kök hücreler
HRP	: Horse redish peroksidaz
IgA	: İmmünglobulin A
IgG	: İmmünglobulin G
IL-4	: İnterlukin 4
IL-5	: İnterlukin 5
IL-6	: İnterlukin 6
IL-7	: İnterlukin 7
IRF4	: Interferon regulatory factor 4
İHK	: İmmünohistokimya
J	: Joining
JIA	: Junevil idiyopatik artrit
kDa	: Kilodalton
MEP	: Megakaryosit/eritrosit projenitör
MGUS	: Önemi bilinmeyen monoklonal gammopati
MHCII	: Major Histokompatibility Kompleks II
ml	: mililitre
MM	: Multiple Miyeloma
MZ	: Marjinal zone
MZL	: Marjinal zone lenfoma
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
NHEJ	: Non homologous end joining
PAX5	: Paired box gene 5
PBS	: Phosphate buffered saline
RB1	: Retinoblastoma 1
RNA	: Ribonükleik asit
RSS	: Recombination signal sequences
RT-qPCR	: Real time polymerase chain reaction
SCF	: Kök hücre faktörü
SHM	: Somatik hipermutasyon
SMM	: Smoldering multiple miyelom
STAT	: Signal Transducer and Activator of Transcription

TBS	:	Tris buffered saline
UPR	:	Unfolded protein response
V	:	Variable
XBP-1	:	X box binding protein 1
β2M	:	β2-mikroglobulin
μl	:	mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Hematopoezin şematik gösterimi.	3
3.1: B hücre gelişimi ve aktivasyonu.	7
4.1: B hücre aktivasyonu sonrası germinal merkez oluşumu.	9
4.2 Plazma hücre gelişiminde rol alan transkripsiyon faktörleri.	10
8.1: EasySep yöntemi ile hücre izolasyonu.	28
9.1: <i>ABL1</i> geni için parafin blok örnekleri kullanılarak elde edilen RT-qPCR analiz sonuçları.	36
9.2: <i>ACTB</i> geni için parafin blok örnekleri kullanılarak elde edilen RT-qPCR analiz sonuçları.	37
9.3: <i>DEK</i> geni için parafin blok örnekleri kullanılarak elde edilen RT-qPCR analiz sonuçları.	38
9.4: Parafin blok örneklerinde <i>DEK</i> mRNA ekspresyonu.	39
9.5: <i>DEK</i> geni RT-qPCR sonuçlarının Mann-Whitney istatistik analizi.	40
9.6: MM hücrelerinin EasySep ile izolasyon sonucu .	43
9.7: MM hastalarının kemik iliğinden izole edilen CD138 ^{pozitif} ve CD138 ^{negatif} hücrelerde ve kontrol kemik iliği hücrelerinde <i>DEK</i> ekspresyonunun RT-qPCR analiz sonucu.	44
9.8: Şekil 9.7’de gösterilen <i>DEK</i> mRNA ekspresyon sonuçlarının Mann-Whitney istatistik analizi.	45
9.9: Kontrol kemik iliği ve <i>DEK</i> geni kopya sayısında artış gösteren MM hastalarının CD138 ^{pozitif} CD138 ^{negatif} hücrelerinin qPCR sonucu.	46
9.10: <i>DEK</i> geni kopya sayısında artış gösteren ve tüm MM vakalarının DNA kopya sayısı ve mRNA ekspresyon seviyesi.	47
9.11: Kontrol kemik iliği kesitlerinde <i>DEK</i> (çekirdekte kahverengi boyanma) ve CD138 antikorlarıyla (hücre yüzeyinde pembe boyanma) ikili İHK boyamasının mikroskopik fotoğrafları.	49
9.12: MM kesitlerinde <i>DEK</i> (çekirdekte kahverengi boyanma) ve CD138 antikorlarıyla (hücre yüzeyinde pembe boyanma) ikili İHK	50

	boyamasının mikroskopik fotoğrafları.	
9.13:	MGUS kesitlerinde DEK (çekirdekte kahverengi boyanma) ve CD138 antikorlarıyla (hücre yüzeyinde pembe boyanma) ikili İHK boyamasının mikroskopik fotoğrafları.	51
9.14:	Kontrol kemik iliği ve <i>DEK</i> geni kopya sayısı CD138 ^{pozitif} hücrelerinde artmış olan 3 MM vakasının DEK ve CD138 antikorlarıyla ikili İHK boyamasının mikroskopik fotoğrafları.	52
9.15:	Marjinal zone lenfoma kesitlerinde DEK (çekirdekte kahverengi boyanma) ve CD138 antikorlarıyla (hücre yüzeyinde pembe boyanma) ikili İHK boyamasının mikroskopik fotoğrafları.	53
9.16:	Burkitt lenfoma kesitlerinde DEK (çekirdekte kahverengi boyanma) ve CD138 antikorlarıyla (hücre yüzeyinde pembe boyanma) ikili İHK boyamasının mikroskopik fotoğrafları.	54
9.17:	DLBCL kesitlerinde DEK (çekirdekte kahverengi boyanma) ve CD138 antikorlarıyla (hücre yüzeyinde pembe boyanma) ikili İHK boyamasının mikroskopik fotoğrafları.	55
9.18:	Lenf düğümü parafin kesitinin DEK (çekirdekte kahverengi boyanma) ve CD138 antikorlarıyla (hücre yüzeyinde pembe boyanma) ikili İHK boyamasının mikroskopik fotoğrafı.	56

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
7.1: Kitler, kimyasallar.	22
7.2: Primer,problar.	23
7.3: Antikorlar.	23
7.4: Cam, plastik ve sarf malzemeler.	23
7.5: Cihazlar.	24
9.1: Kemik iliği örneklerinin alındığı vakaların klinik özellikleri ve normalize edilmiş <i>DEK</i> mRNA ekspresyonu seviyeleri.	35
9.2: RT-qPCR incelemesinde <i>DEK</i> ekspresyonu gözlenen ve gözlenmeyen vakaların klinik evreye göre (MM evre I, II ve III) dağılımı.	39
9.3: Taze veya dondurulmuş kemik iliği hücrelerinin alındığı vakalar.	42

1. GİRİŞ

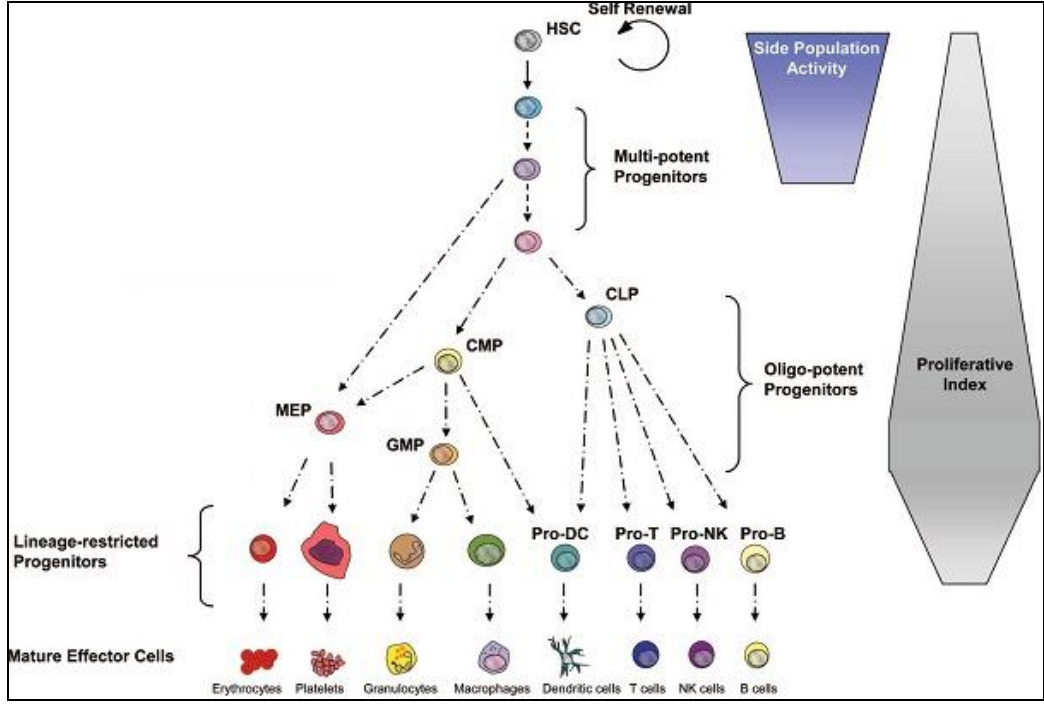
MM B hücrelerinin klonal çoğalmasıyla ortaya çıkan bir kanser türüdür [Hideshima et al., 2004]. Hematolojik kanserlerin % 10'unu, tüm kanser türlerinin % 1'ini MM oluşturmaktadır [Rajkumar, 2011]. Plazma hücrelerinin anormal çoğalması, kemik iliğinde plazma hücrelerinin birikimi ve kanda bulunan monoklonal immunoglobülin (M-proteini) miktarında artışa yol açmakta ve sonuç olarak kemik yıkımı, böbrek iflası, anemi gibi çeşitli doku ve organ yıkımlarına sebep olmaktadır [Chesi and Bergsagel, 2013]. MM oluşumunda kromozom 13q,14q bölgelerinin delesyonları, immunoglobulin ağır zincir geninin dengeli translokasyonları ve kromozom 6p bölgesinin kopya sayısında artış gibi çeşitli kromozom anomalileri sıklıkla görülmektedir [Bergsagel et al., 1996], [Walker et al., 2010].

MM de kopya sayısında artış görülen kromozom 6p22.3 bölgesinde bulunan *DEK* geni, DNA replikasyonu/tamiri, transkripsiyonel düzenlenme, mRNA işlenmesi, kromatin yapısının korunması gibi birçok hücresel olayda görev alan bir proto-onkogendir. *DEK* geninin aşırı ifadesinin hücre proliferasyonunda artışa, hücre yaşlanmasında ise azalmaya sebep olduğu bilinmekte olup mesane kanseri, melanoma, glioblastoma gibi birçok kanser türünde *DEK* geni kopya sayısında ve ifadesinde artış olduğu gösterilmiştir.

MM de 6. kromozomun kısa kolunun (6p22.3 bölgesi) kopya artışı ile *DEK* geni ekspresyonu arasında bir ilişki olup olmadığına dair literatür bilgisi bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında, MM'de sıklıkla hasara uğrayan kromozom 6p bölgesindeki aday genlerden biri olan *DEK*'in kopya sayısı ve ekspresyon seviyesinin tespit edilmesi amaçlanmıştır

2. HEMATOPOETİK SİSTEM

Sağlıklı bir insanda her gün milyonlarca kan hücresi kanama, hastalık yada normal yaşam döngüsünü tamamlaması nedeniyle kaybedilirken, aynı zamanda milyonlarca yeni eritrosit, lökosit ve trombosit oluşumu meydana gelmektedir. Oldukça karmaşık olan bu kan hücresi yapım ve yıkım mekanizması hematopoez olarak adlandırılmaktadır [Smith, 2003]. Yapılan araştırmalar sonucu, kemik iliğinde bulunan ve hematopoetik kök hücreler (HKH) olarak adlandırılan multipotent karakterdeki, küçük bir hücre topluluğunun kendini yenileyebildiği ve vücudumuzda bulunan bütün olgun kan hücrelerine farklılaşma kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir [Weissman, 2000]. Akım sitometrisi analizleri ile hücre yüzey belirteçlerinin incelenmesi sonucu HKH'in farklılaşma kapasitelerinin hiyerarşik bir düzen içerisinde azalmakta olduğu belirlenmiştir [Iwasaki and Akashi, 2007]. Bu hiyerarşik düzen içerisinde en tepede yer alan HKH öncelikle kendini yenileme özelliğini kaybetmiş ve daha az farklılaşma kapasitesine sahip olan multipotent öncül hücreleri oluşturmaktadır. Bu hücreler daha sonra genel myeloid öncül hücreler ve genel lenfoid öncül hücreler olmak üzere, oligopotent karakterdeki iki ayrı hücre serisine farklılaşmaktadır [Seita and Weissman, 2010]. Sonuç olarak; myeloid öncül hücrelerden trombosit, eritrosit, monosit-makrofaj, granülosit (nötrofil, basofil, eosinofil) megakaryosit ve mast hücreleri oluşurken, lenfoid seri hücrelerinden T hücreleri, B hücreleri ve doğal katil hücreleri (natural killer (NK) cells) oluşmaktadır [Iwasaki and Akashi, 2007]. Şekil 2.1' de hematopoez şematik olarak gösterilmiştir [Bryder et al., 2006].



Şekil 2.1: Hematopoezin şematik gösterimi. HSC, hematopoetik kök hücre, CLP, ortak lenfoid öncül hücresi, CMP, ortak myeloid öncül hücresi, MEP, megakaryosit eritrosit öncül hücresi, GMP, granülosit makrofaj öncül hücresi, Pro-DC, dentritik öncül hücre, Pro-T, T öncül hücresi, Pro-B, B öncül hücresi, Pro-NK doğal katil öncül hücresi.

3. B LENFOSİTLERİ

3.1. B Lenfositlerin Gelişimi

B Lenfositleri ve salgıladıkları antikorlar vücudun birçok patojene karşı korunmasında etkin rol oynamaktadır ve bağışıklık sisteminin en önemli unsurlarından biridir [Pieper et al., 2013]. Hematopoetik sistemde yer alan diğer bütün hücreler gibi B lenfositleri de kendini yenileme kapasitesine sahip olan HKH'den köken almaktadırlar. Hematopez sırasında HKH multiprojenitör hücreleri oluşturur. Ardından, multipotent hücreler oligopotent karakterdeki genel lenfoid projenitör hücrelerini (common lymphoid progenitor-CLP) ve genel miyeloid projenitör hücrelerini (common myeloid progenitor-CMP) oluştururlar. CLP hücreleri B lenfositleri, T lenfositleri ve NK hücrelerine farklılaşırken, CMP hücreleri granülosit/makrofaj ve megakaryosit/eritrosit projenitörlerine farklılaşırlar. Granülosit/makrofaj projenitörlerinden monosit, makrofaj ve granülositler oluşurken megakaryosit/eritrosit projenitörlerinden ise megakaryositler, trombositler ve eritrositler oluşmaktadır. Dendritik hücreler ise hem CMP hem CLP hücrelerinden köken alabilmektedirler [Bryder et al., 2006].

B lenfosit gelişimi CLP hücrelerinden sonra ilk olarak pro-B hücrelerinin oluşması ile başlamaktadır. Bu hücreler kısıtlı olarak kendilerini yenileme kapasitesine sahiplerdir ve bölünerek daha fazla pro-B hücresi oluştururlar. Daha sonra pro-B hücrelerinden sırasıyla pre-B hücreleri, olgun olmayan B hücreleri, olgun B hücreleri oluşur. B hücre gelişiminin son aşaması, olgun B hücrelerinin antijenle karşılaşmaları durumunda plazma hücrelerinin oluşmasıdır [Murphy et al., 2008].

Kemik iliğinde, B lenfosit gelişiminde stroma hücreleri önemli rol oynamaktadırlar. Stroma hücreleri B hücreleri ve diğer hematopoetik hücreler için özel bir mikroçevre oluştururlar. B hücreleri ile stromal hücreler arasında adhezyon molekülleri aracılığı ile meydana gelen etkileşimler B hücre gelişimi sırasında önemli rol oynamaktadır. Ayrıca stromal hücreler tarafından salgılanan büyüme faktörleri ve sitokinler B hücre gelişimi ve olgunlaşmasında etkilidir. Örneğin olgun B hücreleri üzerinde bulunan c-Kit tarafından algılanan kök hücre faktörü (stem cell factor (SCF)) ve geç pro-B hücreleri ve pre-B hücrelerinin gelişiminde ve

büyümesinde rol alan interlökin-7 (interleukin-7 (IL-7)) stromal hücreler tarafından salgılanan önemli sitokinler arasındadır [Murphy et al., 2008]. Stroma hücreleri tarafından salgılan CXCL12 kemokini B hücre gelişiminde önemli olan bir diğer kemokindir ve B hücreleri üzerinde bulunan CXCR4 reseptörüne bağlanmaktadır. Ayrıca stroma hücreleri tarafından salgılanan CXCL12 multipotent projenitor hücrelerinin stroma hücrelerine yönelmesine sebep olur ve B hücre gelişimi için önemli olan IL7 salınımını tetikler [Tokoyoda et al., 2004].

3.2. Gen Segment Değişimleri

Vücudumuzda doğada bulunan birçok antijeni tanıyabilen ve bu antijenlere özgü antikolar salgılayabilecek kapasitede büyük çeşitliliğe sahip B hücreleri üretilmektedir. B hücrelerinin çok çeşitli antijen tanıma kapasiteleri bu hücrelerin gelişiminin erken safhalarında meydana gelen ve B hücrelerine özgü olan V(D)J rekombinasyonu olarak adlandırılan gen segment değişimleri ile gerçekleşmektedir. V(D)J rekombinasyonu sırasında B hücre antijen reseptörlerini kodlayan değişken (variable (V)), çeşitlilik (diversity-D) ve birleşme (joining-J) gen bölgeleri somatik olarak farklı kombinasyonlar şeklinde yeniden düzenlenmekte ve böylece B hücreleri için yüksek oranda reseptör çeşitliliği sağlanmaktadır [Herzog et al., 2009]. Bu mekanizmada Ig ağır zincir reseptör bölgesi oluşurken önce D segmenti ile J segmenti birleşir sonrasında V segmenti ve DJ segmenti birleşir. Ig hafif zincirinde ise D segmenti bulunmamaktadır ve yalnızca V ve J segmentleri bir araya gelmektedir [Kuehl and Bergsagel, 2002].

V, D ve J gen bölgeleri korunmuş rekombinasyon sinyal sekansları (recombination signal sequences-RSS) ile kuşatılmış olup rekombinaz enzimleri için tanıma bölgeleri olarak görev yapmaktadırlar. Bu mekanizmada lenfositlere özgü rekombinasyon aktive edici genler 1 ve 2 (Recombination activated genes 1 ve 2) ve homolog olmayan sona katılmada (non homologous end joining-NHEJ) görev alan DNA tamir proteinleri görev almaktadır [Schlissel, 2003].

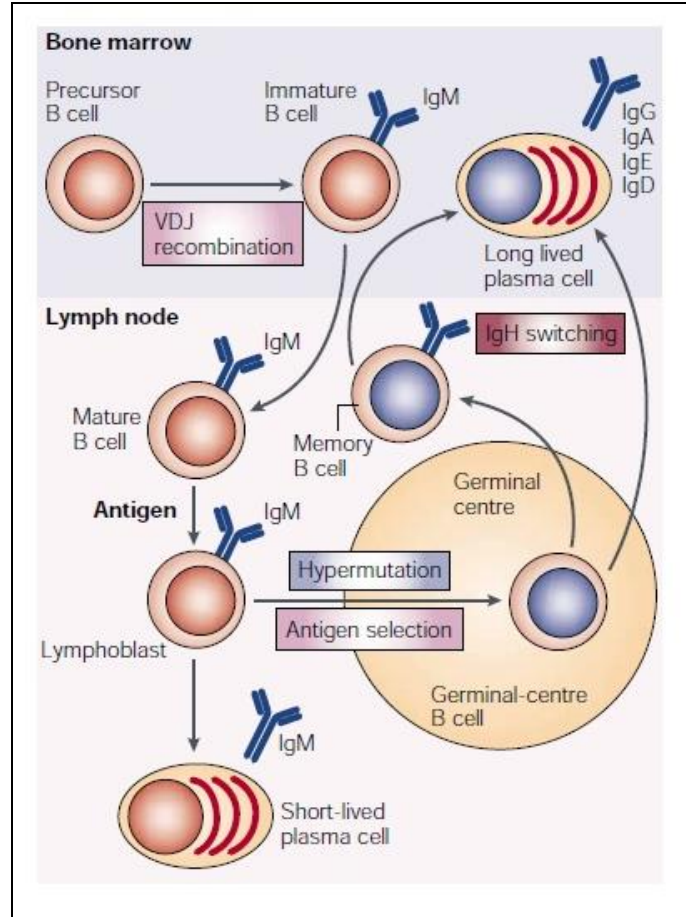
3.3. Self Reaktif B Hücrelerin Klonal Silinimi

B hücre gelişimi sırasında organizmanın kendi hücrelerini tanıyan (self-reactive) ve kendi hücrelerine karşı antikor salgılayan hücreler meydana gelebilmektedir. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda olgun olmayan B hücrelerinin %50 ila %70'inin self reaktif olduğu belirlenmiştir. Bu oranın insanlar için de geçerli olduğu tahmin edilmektedir [Grandien et al., 1994]. Self-reaktif hücrelerin vücuda zarar vermemesi ve otoimmün hastalıkların önlenmesi amacıyla kemik iliğinde bu hücrelerin negatif seçiliminin gerçekleşmesi büyük önem taşımaktadır. Negatif seçim sırasında hücreler vücuda ait antijenlere bağlanma kapasitelerine göre seçilmekte ve yüksek oranda affinite gösteren hücreler apoptoz ile klonal olarak silinmektedirler. Ancak self antijenlere düşük affinite ile bağlanan self reaktif B hücreleri reseptör değişimi (reseptör editing) mekanizması ile immünoglobülin hafif zincirlerinde (immunoglobulin light chain-Ig L) ikincil bir gen segment değişimine uğrayarak antijen reseptör bölgelerinde değişikliğe uğrarlar ve self reaktivlikleri ortadan kalkarsa klonal silinmeye uğramazlar [Seagal and Melamed, 2003]. Reseptör değişimiyle de self reaktivliği ortadan kalkmayan ve self antijenlere düşük afinite ile bağlanan çoğu B hücresi klonal silinmeye uğramamaktadır ve periferde geçebilmektedirler. Bu hücreler anergi olarak adlandırılan bir mekanizma ile antijene karşı kalıcı olarak duyarsız hale getirilirler ve antijenle bağlansalar bile B hücre aktivasyonuna uğramazlar [Yarkoni et al., 2010].

3.4. B Hücre Aktivasyonu

Olgunlaşmamış B-hücreleri hücre yüzeylerinde IgM taşımaktadırlar ve çeşitli adhezyon molekülleri yardımıyla kemik iliğinden ayrılarak dalak, tonsiller, mukozal dokular Peyer Plakları gibi ikincil lenfoid organlara göç ederler [Pieper et al., 2013]. B-hücrelerinin hücre membranlarında taşıdıkları Ig molekülleri B hücre reseptörü olarak görev alırlar. Bu hücreler bu reseptörleri aracılığıyla glikoproteinler, polisakkaritler, virüs veya bakteri partikülleri gibi birçok antijene belirli epitopları ile bağlanmaktadır. Reseptör ve antijen arasında gerçekleşen bu spesifik bağlanma üzerine antijen endositoz ile hücre içine alınır, enzimlerle parçalanır. Oluşan peptidler major histokompatibility kompleks II (MHCII) adı verilen antijen

sunumunda görev alan özel moleküllerle birlikte T hücrelerine sunulmak üzere hücre yüzeyine gönderilir. Aynı antijenle daha önce aktive olmuş T hücreleri B hücre yüzeyinde bulunan antijen-MHCII kompleksini tanır ve B hücrenin aktive olması için gerekli olan IL-4, IL-5 ve IL-6 gibi sitokinleri salgılar. Aktive olmuş B hücresi çoğalmaya ve farklılaşmaya başlar ve plazma hücrelerini ya da hafıza B hücrelerini oluşturur. Bazı mikrobiyal antijenler ise B hücrelerini T hücre yardımı olmaksızın aktive edebilmektedirler ve böylece çoğu antijene karşı ani bir immün cevap verilebilmektedir. Ancak bu durumda antijene karşı oluşturulan antikorlar T hücre yardımıyla oluşturulan antikora nazaran antijene karşı yüksek afinite göstermemektedir ve daha zayıf bir cevap oluşturulmaktadır. Şekil 3.1’de B hücre gelişimi ve aktivasyonu gösterilmiştir [Kuehl and Bergsagel, 2002].

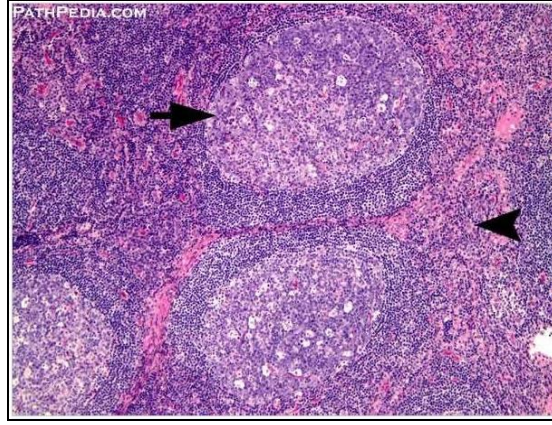


Şekil 3.1: B hücre gelişimi ve aktivasyonu.

4. PLAZMA HÜCRELERİ

4.1. Plazma Hücresi Gelişimi

Plazma hücreleri lenfoid organlarımızdaki hücrelerin %1'inden azını oluşturmaktadır ve antikor oluşumundan sorumludurlar [Fairfax et al., 2008]. Olgun B hücreleri antijen ile karşılaşmaları durumunda farklılaşmaya ve çoğalmaya başlarlar [Kuehl and Bergsagel, 2002]. Bu aşamada farklılaşarak sentroblastları oluşturan B hücreleri sekonder lenfoid dokularda, Şekil 4.1'de gösterildiği gibi germinal merkez olarak adlandırılan yapıları oluştururlar [Web 1]. Sentroblastlar, germinal merkezleri oluşturduktan sonra bu yapıların karanlık bölge (dark zone) olarak adlandırılan bölgelerinde çoğalmaya devam ederler [Klein and Dalla-Favera, 2008]. Bu aşamada somatik hipermutasyon (SHM) olarak adlandırılan mekanizma ile Ig hafif ve ağır zincirlerindeki değişken (variable) bölgelerde mutasyonlar oluşturulur ve böylece antikorların antijene olan afinitesi arttırılmış olur [Shapiro-Shelef and Calame, 2005]. Daha sonra sentroblast hücreleri sentosit hücrelerine farklılaşır ve germinal merkezin aydınlık bölgesine (light zone) yönelerek burada antijen sunan yardımcı T hücreleri ve dendritik hücreler yardımıyla antijene olan afiniteleri test edilerek seçilime uğrarlar. Düşük afiniteye sahip olan hücreler apoptoza uğrayarak yok edilirler. Yüksek afiniteye sahip olanlar ise immunoglobulin sınıf tipinde değişiklik (Ig class switching) geçirirler [Klein and Dalla-Favera, 2008]. Böylece normalde IgM ye sahip olan bu hücreler diğer Ig tiplerini de salgılayabilirler [Kuehl and Bergsagel, 2002]. Sentosit hücreleri plazmablastlara ve sonrasında plazma hücrelerine ya da hafıza hücrelerine farklılaşırlar ve kemik iliğine göç ederler [Klein and Dalla-Favera, 2008], [Kuehl and Bergsagel, 2002].



Şekil 4.1: B hücre aktivasyonu sonrası germinal merkez oluşumu. Ok ile gösterilen alan germinal merkezi gösterirken, yarım ok ile gösterilen alan folliküller arası alanı göstermektedir.

4.2. Plazma Hücre Gelişiminde Rol Alan Transkripsiyon Faktörleri

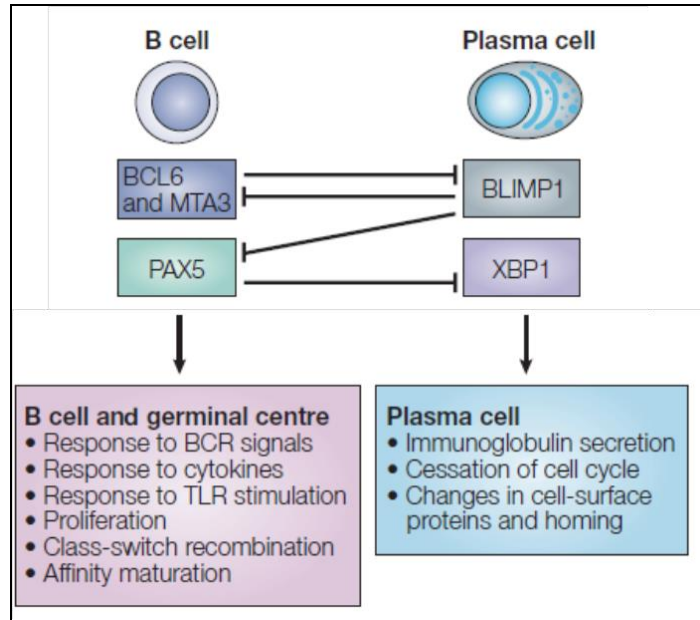
Plazma hücre gelişiminde rol oynayan en önemli transkripsiyon faktörü BLIMP-1'dir. B hücrelerinde ektopik olarak BLIMP-1 ekspresyonu sağlandığında B hücrelerinin plazma hücrelerine farklılaştığı gözlemlenmiştir [Turner et al., 1994]. BLIMP-1, MYC gibi genleri baskılayarak hücre döngüsünün durdurulmasını sağlayarak B hücre çoğalmasını baskılar ve plazma hücre farklılaşmasını uyarır. Aynı zamanda B hücre gelişimde rol alan genlerin susturulmasında ve antikor salgılanmasında etkili olan genlerin ekspresyonunun uyarılmasında rol oynar [Shapiro-Shelef and Calame, 2005].

BLIMP-1 in kontrolünde olan X box binding protein 1 (XBP-1) plazma hücre gelişiminde etkili olan bir diğer önemli proteindir [Pieper et al., 2013]. Plazma hücrelerinde sürekli olarak antikor üretildiğinden dolayı çok yüksek oranda protein sentezlenmektedir. Protein sentezi sırasında endoplazmik retikulum (ER)'da yanlış katlanan proteinlerin doğru katlanması ve düzeltilemeyen proteinlerin degradasyonu sağlanır. BLIMP-1, proteinlerin doğru katlanması ve yanlış katlanan proteinlerden kaynaklanan ER stresinin ortadan kaldırılması için katlanmamış protein cevabı (unfolded protein response-UPR) oluşturulmasında etkili olur. Bu etkisini, XBP-1 ve UPR'de görev alan diğer genlerin ekspresyonunu uyararak sağlamaktadır [Lee et al., 2003].

Plazma hücre gelişiminde rol oynayan diğer transkripsiyon faktörleri, paired box gene 5 (PAX5) ve B-hücre lenfoma 6 (B cell lymphoma-BCL6) proteinleridir.

PAX5 genel lenfoid seri hücrelerinin B hücrelerine farklılaşmasında ve B hücre karakterinin devam ettirilmesinde rol almaktadır [Pieper et al., 2013]. BCL6 ise germinal merkez oluşumunda ve B hücre farklılaşmasının baskılanmasında etkilidir. PAX5 ve BCL6, B hücre karakterinin devamını sağlarken plazma hücre farklılaşmasını baskılamaktadırlar [Fairfax et al., 2008].

Plazma hücre farklılaşmasını uyaran BLIMP1, XBP1 ve farklılaşmayı baskılayan PAX5 ve BCL6 transkripsiyon faktörleri arasındaki denge Şekil 4.2’de şematize edilmiştir [Shapiro-Shelef and Calame, 2005]. BCL-6 transkripsiyon faktörü BLIMP-1’i baskımlarken, PAX-5 XBP-1’i baskılamaktadır. BLIMP-1 ise BCL6 ve PAX5 i baskılamaktadır [Fairfax et al., 2008].



Şekil 4.2: Plazma hücre gelişiminde rol alan transkripsiyon faktörleri.

Ayrıca BLIMP-1’in, hücre döngüsünde görev alan proteinlerin ekspresyonunu baskıladığı bilinmektedir [Shaffer et al., 2002]. BLIMP-1 tarafından baskılanan ve hücre döngüsünün S fazında görev alan E2F, DEK promotor bölgesine bağlanmaktadır ve DEK’in ekspresyonu sağlamaktadır [Carro et al., 2006].

4.3. Plazma Hücresi ve Hematopoetik Kanserler

B hücre lenfomalarının çoğu germinal merkez B hücrelerinden köken almaktadırlar. B hücrelerinin normal gelişimi sırasında meydana gelen somatik hipermutasyonlar, Ig sınıf değişimleri, V(D)J rekombinasyonları gibi mekanizmalar bazı durumlarda önemli genlerde mutasyonlara sebebiyet verirler. B hücrelerde sıklıkla görülen kromozomal translokasyonlar sırasında signal transducer and activator of transcription (STAT), nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell (NF-kB) , BCL6, PAX5, BLIMP1, interferon regulatory factor 4 (IRF4), XBP1 gibi birçok gen bölgesinde mutasyon görülür ve bu mutasyonlar B hücre lenfomalarının gelişimine sebep olurlar. Örneğin; Burkitt lenfoma'da görülen t(14;18) translokasyonu MYC genini etkilerken, t(8;14) translokasyonu Ig ve BCL2 gen bölgelerini etkilemektedir. Diffuse Large B cell Lymphoma (DLBCL) da BCL6 gen bölgesi hasar görür ve bu nedenle germinal merkez B hücrelerinin çoğalması baskılanamaz [Schmidlin et al., 2009].

MM oluşumunda da bir çok kromozomal anomali görülmektedir. B hücre gelişimi sırasında meydana gelen kromozom 13q,14q bölgelerinin delesyonları, immunoglobulin ağır zincir geninin dengeli translokasyonları, 3, 5, 6, 7, 9, 11, 15 ve 19. kromozomlarda kısmi ya da tüm kromozom artışı ile meydana gelen trisomiler MM'da sıklıkla görülen kromozomal anomaliler arasındadır [Bergsagel et al., 1996], [Walker et al., 2010].

5. MULTİPLE MİYELOM

5.1. Hastalık ve Belirtileri

MM habis karakterdeki monoklonal plazma hücrelerinin kemik iliğinde anormal çoğalması ve birikimi ile sonuçlanan hematolojik bir kanser türüdür [Yang et al., 2013]. MM bütün kanser türlerinin %1 ini ve hematolojik kanser türlerinin yaklaşık % 10 unu oluşturmaktadır [Rajkumar, 2011]. Erkeklerde görülme sıklığı kadınlara göre daha yüksek olan MM ilerleyen yaşlarda görülmekle birlikte yaş ortalaması 65 yaştır [Kyle et al., 2003]. MM için kesin bir tedavi yöntemi bulunmazken, var olan tedavi yöntemleriyle hastalığın gerilemesi hedeflenmekte ve yaşam süresi olabildiğince uzatılmaya çalışılmaktadır [Yang et al., 2013]. MM tanısı konulurken öncelikle serumda ya da idrarda monoklonal protein (M proteini) veya immunoglobülin hafif zinciri varlığı dikkate alınmaktadır [Chesi and Bergsagel, 2013]. Hastalığın diğer bulguları arasında kansızlık, kemik lezyonları, böbrek yetmezliği, immünyetmezlik ve hiperkalsemi (kanda kalsiyum miktarının artması) yer almaktadır [Singhal and Mehta, 2006]. Özellikle MM hücrelerinin kemik yapısını işgal etmesi ile birlikte habis plazma hücrelerinden salgılanan sitokinler nedeniyle kemik matriksinin yıkımında görev alan osteoklast aktivitesinde artış görülmektedir. Öte yandan kemik iliği stromal hücrelerinin kemik yapımından sorumlu osteoblast hücrelerine farklılaşması baskılanmakta, anjiyogenez uyarılarak yeni kan damarlarının oluşumu sağlanmaktadır. Osteoklast ve osteoblast hücreleri arasındaki dengenin bozulması sonucu kemik yapısında oluşan lezyonlar sonucu patolojik kemik kırılmalarında %20 oranında artış görülmektedir. Kemiklerde meydana gelen kırılmalar ve erimeler nedeniyle kemik ağrıları yaşanmakta ve hastaların yaşam kalitesi olumsuz yönde etkilenmektedir. Ayrıca osteoklast aktivitesinin artmasıyla tetiklenen hiperkalsemi meydana gelmektedir [Galson et al., 2012]. İmmunoglobülin hafif zincir birikmesi sonucu (>10g/d) böbrek yetmezliği gelişmekte ve vakaların %80'inde proteinüri (idrarda protein görülmesi) gözlenmektedir [Korbet and Schwartz, 2006].

5.2. Hastalığın Seviyelendirilmesi

MM seviyelendirilmesi için önceki yıllarda Briang. M. Durie ve Sydney E. Salmon tarafından geliştirilen Durie/Salmon(DS) seviyelendirme sistemi kullanılmıştır. Bu sistemde önemli olan dört kriter olarak; kemik lezyonlarının boyutu, kandaki hemoglobin seviyesi, serumdaki kalsiyum seviyesi ve serumdaki / idrardaki M-proteini seviyesi belirlenmiştir. Ayrıca; bu yöntemde böbreklerin sağlık durumunu belirleyebilmek için kandaki kreatin(Cr) seviyesi ölçülmektedir. MM hücreleri tarafından artan immunoglobulin hafif zincir salınımı sonucu böbrekler hasar görmekte ve normalde böbrekler tarafından temizlenmesi gereken kreatin seviyesi artmaktadır. DS seviyelendirme sisteminde hastalar Seviye I, Seviye II ve Seviye III olarak sınıflandırılmaktadırlar [Durie and Salmon, 1975].

Seviye I: Aşağıdaki kriterlerin hepsini taşıyan vakalar;

- Az sayıda miyelom hücresi bulunur
- Hemoglobin seviyesi normal (>10 g/100ml)
- Kalsiyum seviyesi normal (≤ 12 mg/100ml)
- Kemik yapısında lezyon yok ya da yalnızca bir bölgede lezyon var (0. Düzey)
- Düşük M-proteini seviyesi
 - Ig G değeri <5 g/100 ml
 - Ig A değeri <3 g/100 ml
 - İdrardaki M-proteini elektroforez sonucu < 4 g/24 saat

Seviye II: Seviye I ve Seviye III arasında kalan değerlere sahip vakalar

Seviye III: Aşağıdaki kriterlerden bir ya da daha fazlasına sahip olan vakalar;

- Hemoglobin seviyesi <8.5 g/100ml
- Kalsiyum seviyesi >12mg/100ml
- Kemik yapısında ileri düzey lezyonlar (3. Düzey)
- Yüksek M-proteini seviyesi
 - Ig G değeri >7 g/100 ml
 - Ig A değeri >5 g/100 ml
 - İdrardaki M-proteini elektroforez sonucu >12 g/24 saat

Alt sınıflandırma ;

- A: normal böbrek fonksiyonu (kreatin değeri <2.0 mg/100 ml)
- B: hasarlı böbrek fonksiyonu (kreatin değeri $\geq$ 2.0 mg/100 ml)

DS seviyelendirme sistemi yıllarca standart tanı sistemi olarak kabul görmesine karşın önemli kriterlerinden biri olan kemik lezyonlarının seviyelendirilmesinin objektif olarak yapılması mümkün olmamıştır. Daha güvenilir kriterler için yapılan çalışmalar sonucu serumdaki beta2-microglobulin (S β 2M) seviyesi en güvenilir tanı faktörü olarak belirlenmiştir. Ayrıca; hastalığın seviyelendirilmesinde; serumdaki C-reaktif protein, albumin, plazma hücrelerinin çoğalma indeksi, akım sitometrisi ile bakılan hücre döngüsü analizleri, karyotipleme ya da floresan in situ hibridizasyon (FISH) ile belirlenen kromozom anomalileri sonuçları da değerlendirilmektedir.

Ancak 2005 yılında kabul edilen “Uluslararası Seviyelendirme Sistemi (International Staging Sistem)’ne göre ayırıcı tanıda önemli olan kriter olarak serumdaki S β 2M seviyesine ek olarak albumin seviyesi de eklenmiştir. Bu sistemde;

- Seviye I: Ortalama yaşam süresi 62 ay
 - S β 2M < 3.5 mg/L
 - Serum albumin $\geq$ 3.5 g/dL
- Seviye II: Ortalama yaşam süresi 44 ay
 - Seviye I ve Seviye III dışındaki değerler
- Seviye III: Ortalama yaşam süresi 29 ay
 - S β 2M $\geq$ 5.5 mg/L

Uluslararası Seviyelendirme Sistemi’ne göre seviye ilerledikçe hastaların yaş ortalaması artarken aynı zamanda anemi (hemoglobin <10 g/dL), trombositopeni (trombosit <130,000/ μ L) oranlarında yükselme ve kemik iliğinin plazma hücreleri tarafından istilasında artış olduğu saptanmıştır. DS seviyelendirme sisteminde Seviye III(A veya B) olarak belirlenen hastaların Uluslararası Seviyelendirme Sistemi’ne göre % 38 oranında Seviye I de, %54 oranında seviye II’de, % 70 oranındaysa Seviye III’de oldukları belirlenmiştir. DS seviyelendirme sisteminde Seviye IIIB de

görülen hastaların %100 ünün Uluslararası Seviyelendirme Sistemi'ne göre Seviye III de oldukları tespit edilmiştir [Greipp et al., 2005].

5.3. Multiple Miyelomun Oluşma Sebepleri ve Tedavisi

MM post germinal merkezde bulunan B hücrelerinin klonal olarak çoğalması ile meydana gelen bir hastalıktır. Hastalığın oluşmasında, genetik ve mikroçevresel etkenler rol oynamaktadır. Hastalığın seyri genellikle Önemi bilinmeyen Monoklonal Gammopati (MGUS) ile başlamakta olup, MGUS'un Smoldering Miyelom'a ve ardından tüm semptomları ile birlikte MM'a dönüşmesi ile tamamlanmaktadır [Kuehl and Bergsagel, 2002]. MM hücrelerinde birçok genetik anomali gözlenmektedir [Avet-Loiseau et al., 2007].

Naif B hücrelerinin olgunlaşması için gereken V(D)J rekombinasyonları, somatik mutasyonlar ve izotip döngüsü sırasında birçok DNA kırıkları meydana gelmektedir ve bu nedenle B hücreleri kalıtsal olarak kromozomları açısından kararlı yapıda değildirler. Sitogenetik analizler (Giemsa, G bantlama) sonucu MM vakalarının % 30-50'sinde translokasyon, delesyon, duplikasyon gibi kromozomal anomaliler tespit edilmiştir [Sirohi and Powles, 2004]. FISH yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada vakaların %96'sında, diğer bir çalışmada ise vakaların %89'unda en az bir kromozom için trisomi saptanmıştır [Mahindra et al., 2010]. MM da sıklıkla görülen kromozomal anomaliler 13. Kromozomun kaybı sonucu oluşan monosomi, ve 3, 5, 6,7, 9, 11, 15, ve 19. kromozomlarda kısmi ya da tüm kromozom artışı ile meydana gelen trisomiler ya da gen kopya sayısında görülen artışlardır [Bergsagel et al., 1996], [Walker et al., 2010]. Ig ağır zincirini kodlayan 14q32 gen bölgesini etkileyen translokasyonlar vakaların %20-40'ında görülmektedir. Siklin D1 proteinini kodlayan genin yer aldığı 11q13 kromozom bölgesini etkileyen translokasyonlar ise vakaların %20'sinde gözlenmektedir. Birçok primer tümörde Siklin D1'in transkripsiyonel aktivasyonu gözlemlenmiş olmak ile birlikte t(6;14)(p21;q32) translokasyonunun Siklin D3 aktivasyonuna yol açtığı saptanmıştır [Bergsagel et al., 1996].

Kromozom 13'de gerçekleşen kısmi ya da tüm kromozom delesyonu MM vakalarının %50'sinde gözlenmektedir ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir [Singhal and Mehta, 2006]. Kromozom 13'de meydana gelen delesyonun bu bölgede yer alan

önemli tümör baskılayıcı genlerden biri olan retinoblastoma (RB) geninin ekspresyonunun etkilenmiş olabileceği düşünülmektedir [Fonseca et al., 2009].

Yeni tanı almış MM vakalarının çoğunda c-MYC ekspresyonunda artış tespit edilmiştir. MGUS fare modelinde yapılan çalışmalar sonucu germinal merkez B hücrelerinde myc aktivasyonunun MM gelişimine sebep olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle MYC aktivasyonunun MGUS'un MM'ye gelişiminde önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir [Kuehl and Bergsagel, 2012].

17. kromozomun kısa kolunun delesyonu sonucu TP53 tümör baskılayıcı geni kaybedilmektedir. Del17p taşıyan MM vakalarının %37'sinde TP53 mutasyonu görülmektedir. Bu mutasyonun MM'da kötü prognozla ilişkili olup olmadığı bilinmemektedir [Pichiorri et al., 2010].

MM'da 1. kromozomun 1q bölgesinde kopya sayısında artış, 1p bölgesinde ise delesyonlar görülmektedir. 1q bölgesinde bulunan ilgili genler bilinmemekle birlikte 1p'de yer alan siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2C (cyclin-dependent kinase inhibitor 2C-CDKN2C, p18 veya INK4C olarak da bilinmektedir) ve sekans benzerliği taşıyan aile 46C (family with sequence similarity 46, member C-FAM46C) genlerinin ekspresyonlarında meydana gelen değişimlerin kötü prognoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir [Kuehl and Bergsagel, 2012]. 4. kromozom ve 14. kromozomlar arasında meydana gelen translokasyonlar sonucu fibroblast büyüme faktörü 3 (fibroblast growth factor 3-FGFR3) geninin ekspresyonu artmakta ve bu artış hücre proliferasyonunda artışa ve apoptozun baskılanmasına sebep olmaktadır [Hideshima et al., 2007], [Chesi et al., 2001].

MM tedavisinde hastalığın seyrine, risk faktörlerine ve komplikasyonlarına göre öncelikli olarak yüksek doz kemo-radyoterapi ve otolog kök hücre nakli gibi farklı tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. Hastalığın nüks etmesini engellemek için yapılan idame tedavisinde ise prednisone ilacı ve kemo-radyoterapi uygulanmaktadır. MM'da kandaki M proteini seviyesi ya da semptomlara göre yapılan sınıflandırma ile oluşturulan risk faktörlerine göre belirlenen tedavi yaklaşımları ile hastaların tedaviye verdikleri cevaplar iyileştirilememektedir. Bu nedenle hastaların tedaviye cevap vermesi ve sağ kalım oranlarının artması için risk faktörlerinin sitogenetik yöntemler gibi moleküler teknikler kullanılarak genetik bazda kişiye özel olarak belirlenmesi gerekmektedir. MM tedavisinde thalidomide gibi immunmodülatör ajanlar ve bortezomib gibi proteozom inhibitörleri kullanılmasıyla birlikte hastaların sağkalım süreleri arttırılmıştır. Thalidomide sebep olduğu yüksek toksisiteden dolayı

uzun süreli olarak kullanılamamaktadır. MM tedavisinde önerilen başlıca tedavi yöntemi olarak kök hücre nakli için aday olan hastalar için bortezomib/cyclophosphamide/dexamethasone kombinasyonu, kök hücre nakli için uygun olmayan hastalar için ise bortezomib/dexamethasone veya melphalan/prednisone/lenalidomide ilaç kombinasyonları önerilmektedir. Tedaviye cevap veren hastaların çoğunda hastalık nüksetmektedir, bu nedenle hastalığın oluşumunda rol alan moleküler mekanizmaların aydınlatılması ve bu mekanizmaları hedefleyen daha etkili ilaç kombinasyonlarının geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır [Yang et al., 2013].

6. DEK

6.1. *DEK* Geninin Karakterizasyonu

6. ve 9. kromozomlar arasında meydana gelen t(6;9) translokasyonu akut myeloid lösemisinin (AML) özel bir alt grubu ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan çalışmalar 9. Kromozomda meydana gelen kırıkların *Cain (Can)* geninin intron bölgesinde yoğunlaştığını göstermiştir. AML hastalarının kemik iliği örnekleri kullanılarak yapılan çalışmalarda *Can* geninin 3' ucunu hedefleyen cDNA problemleri ile AML'ye özgü 5.5 kb uzunluğunda yeni bir transkript saptanmıştır. cDNA klonlama ile bu transkriptin 6. kromozomda yerleşik olan bir gen ve 3' CAN tarafından kodlanan bir füzyon olduğu saptanmıştır. 6. Kromozomda lokalize olduğu saptanan gen, bu çalışmada kemik iliği örneği kullanılan AML hastasının isim/soyisminin baş harfleri "DK" kullanılarak "DEK" olarak adlandırılmıştır. Bazı AML vakalarında gözlenen t(6;9) translokasyonu sonucunda, anormal *DEK-CAN* füzyon geni oluşmakta ve bu genin kodladığı 165 kDa ağırlığında olan kimerik DEK-CAN füzyon proteini kodlanmaktadır [von Lindern et al., 1992].

6.2. DEK' in Yapısal Özellikleri ve Hücresel Fonksiyonları

DEK pek çok hücre türünde yüksek miktarda eksprese edilen (HeLa hücreleri için hücre çekirdeğinde 4-6 milyon kopya) hücre çekirdeğinde lokalize olan bir proteindir [Kappes et al., 2001]. İnsanda bulunan DEK proteini 375 aminoasit içerir ve bir adet DNA bağlanma bölgesi ve 4 adet asidik bölgesi bulunmaktadır. DEK proteini süper helikal yapıdaki DNA bölgelerine bağlanır. DEK proteininin mRNA kırılmasında, co-represör bir protein olan Daxx proteini ve histon deasetilazlar ile etkileşime girerek transkripsiyonun baskılanmasında, aktivatör protein AP-2'nin hedef DNA bölgesine bağlanmasını indükleyerek transkripsiyonun aktivasyonunda görev aldığı belirlenmiştir [Kappes et al., 2004]. Bu nedenle DEK proteinin bazı genlerin transkripsiyonunda ve kromatin yapısının korunmasında görev aldığı düşünülmektedir [Hu et al., 2005].

Ayrıca DEK proteinin sistemik lupus eritematozus, sarkoidoz ve junevil idiyopatik artrit (JIA) gibi bazı otoimmün hastalıklarda otoantijen olarak işlev gördüğü, hücre dışına salgılanarak CD8⁺ T hücreleri ve doğal katil hücreler için kemoatraktant etki gösterdiği tespit edilmiştir [Mor-Vaknin et al., 2006; Waldmann et al., 2004] .

6.3. DEK Proteininin Tümör Oluşumundaki Rolü

Gen ekspresyonunun seri analizi (Serial analyses of gene expression- SAGE) ve mikroarray çalışmaları ile DEK ekspresyonunun bazı tümör ve tümör hücre hatlarında hasar gördüğü belirlenmiştir. DEK ekspresyonunun hepatoselüler karsinomda, glioblastomda, AML hastalarında, primer retinoblastoma ve mesane kanseri dokularında normal dokulara oranla arttığı belirlenmiştir. Ayrıca human papilloma virüsü (HPV) viral onkogenleri E6 ve E7'nin DEK ekspresyonunun artışına ve hücrelerin senesensden kaçmasına neden olduğu gösterilmiştir [Carro et al., 2006].

Keratinositlerde yapılan çalışmalarda, DEK'in aşırı ekspresyonunun, viral protein E7 yokluğunda da tümör oluşumuna yol açtığı gözlenmiştir. HPV pozitif olan rahim ağzı kanseri hücrelerinde DEK ekspresyonunun baskılanmasının p53 yolağı üzerinden apoptoza sebep olduğu ve DEK knockout farelerin deri papillomalarına direnç gösterdikleri belirlenmiştir. Baş ve boyun skuamöz hücre karsinomu (Head and neck squamous cell carcinoma-HNSCC) için geliştirilen bir transgenik fare modelinde, DEK'in E7 transgenik-epidermal hücreleri ve HNSCC tümör hücrelerinin çoğalması için gerekli olduğu gösterilmiştir. Ayrıca DEK ekspresyonunun baskılanmasının HPV pozitif ve negatif HNSCC'de hücre proliferasyonunun baskılanmasına sebep olduğu belirlenmiştir [Adams et al., 2014].

Elde edilen bu veriler anormal DEK ekspresyonu ve kanser oluşumu arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir [Carro et al., 2006].

6.4. DEK Geni ve Multiple Miyeloma

Kromozom 6p MM'da kopya sayısında artış görülen bölgeler arasında yer almaktadır. MM hastalarından alınan kemik iliği örneklerinden akım sitometrisi yöntemiyle izole edilen CD138^{pozitif} plazma hücreleri ile yapılan çalışmalarda, MM vakaların %22.8'inde 6. kromozomda kopya sayısında artış olduğu belirlenmiş ve kopya sayısında en çok artış görülen bölge olarak *DEK* geninin de lokalize olduğu 6p22.3 bölgesi saptanmıştır [Walker et al., 2010]. Yapılan diğer çalışmalarda melanoma, mesane kanseri ve retinoblastoma gibi pek çok tümörde kromozom 6p bölgesindeki kopya artışı ile ilişkili olarak *DEK* ekspresyonunda da artış olduğu belirlenmiştir. Ancak, MM'da 6. kromozomda meydana gelen kopya sayısı artışının *DEK* genini ve *DEK* ekspresyon seviyesini etkileyip etkilemediğine dair bir literatür bilgisi bulunmamaktadır. Bu yüksek lisans tezinin amacı, MM hastalarının kemik iliği örnekleri kullanılarak *DEK* geni kopya sayısının ve *DEK* ekspresyon seviyesinin tespit edilmesidir.

7. MATERİYAL

7.1. Biyolojik Materyaller

7.1.1. Parafin Blok Örnekleri

Çalışmamızda, parafin bloklardan RNA izolasyonunda kullanılmak üzere İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji ABD elektronik arşiv sistemi taranarak 2004-2008 yılları arasında MM tanısı almış vakalar ve normosellüler özellikteki kemik iliği örnekleri belirlendi ve bu vakaların daha önce hazırlanmış olan Hematoksilen ve Eozin (H&E) ile boyalı preparatları incelendi. Bu vakalardan çalışmamız için yeterli ya da kısmi yeterli olan vakalardan 30 MM ve 8 kontrol olmak üzere toplam 38 vaka uygun olarak belirlendi ve arşivden çıkarıldı. Çalışma için gerekli etik kurul kararı, İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan sağlandı.

Çalışmamızın ikinci basamağında, Vanderbilt Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ABD elektronik arşiv sistemi taranarak 2011-2013 yılları arasında MM, MGUS, marjinal zone lenfoma (MZL), Burkitt lenfoma ve diffüz büyük hücreli B hücre Lenfoma (Diffuse large B cell lymphoma-DLBCL) tanısı almış vakalar ve normosellüler özellikteki kontrol kemik iliği örnekleri belirlendi ve bu vakaların daha önce hazırlanmış olan H&E ile boyalı preparatları incelendi. Bu vakalardan MM (n=27), MGUS (n=13), MZL (n=7), Burkitt lenfoma (n=3), ve DLBCL (n=12) tanısı almış vakalar ve 9 adet kontrol kemik iliği örneği çalışmamız için yeterli ya da kısmi yeterli olarak belirlendi ve arşivden çıkarıldı.

7.1.2. Taze Kemik İliği Doku Örnekleri

Vanderbilt Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji A.B.D.'na tanı amacıyla gelen vakalara ait taze kemik iliği örnekleri veya daha önce MM tanısıyla sıvı azotta dondurulmuş kemik iliği örnekleri kullanıldı. Çalışma için gerekli etik kurul kararı, projemiz kapsamında ortak çalışma yürüttüğümüz Yrd. Doç. Dr. Annette Kim tarafından Vanderbilt Üniversitesi Etik Kurul'undan [IRB] sağlandı.

7.2. Kimyasallar ve Cihazlar

Tablo 7.1: Kitler, kimyasallar.

Ürün	Katalog Numarası	Firma
ACK Lysing buffer	RGF-3015	KD Medical
RPMI Medium	22400-089, Gibco	Life Technologies
DMSO	BP231-1	Fisher Scientific
FBS	26140-111, Gibco	Life Technologies
mirVana™ miRNA Isolation Kit	AM1561, Ambion	Life Technologies
Etanol	BP2818-4, (200 proof)	Fisher Scientific
Asit Fenol	AM9720, Ambion	Life Technologies
QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	51104	Qiagen
Nükleaz içermeyen su	AM9932, Ambion	Life Technologies
High capacity cDNA Kit	4368814	Applied Biosystems
2X Taqman Universal Master Mix	4324018	Applied Biosystems
Ecomount Kapatma Maddesi	EM897L	Biocare
Absolut Etanol	32221	Sigma
Ksilol	16446	Sigma
Denature edici solüsyon	DNS001H	Biocare
Warp red kromojen kiti	WR806H	Biocare
Amonyak	05003	Sigma
Gill's Hematoksilen	HXGHE1LT	American MasterTech
Hidrojen peroksit	H1009	Sigma
VanGogh antikor sulandırma çözeltisi	PD90JJ	Biocare Medical
DAB kromojen kiti	DS900H	Biocare Medical
Tris buffered Saline	TBS999	ScyTek
Borg Decloaker, RTU	BD1000S-250,MM,G1 BDS1000G1	BioCare
Tryphan Blue	T10282	Invitrogen

Tablo 7.2: Primer, probalar.

Ürün	Katalog Numarası	Firma
DEK, human	Hs04904663_cn	Applied
RNase P, human	4403326	Applied
DEK, human	Hs00180127_m1	Applied
ACTIN, human	Hs01060665_g1	Applied

Tablo 7.3: Antikorlar.

Ürün	Katalog	Firma
Fare anti-insan DEK antikor	610948	BD
Fare anti-insan CD138 antikor, B-	CM-167K	Biocare
HRP konjuge anti-fare antikor	MHRP520G	Biocare
Alkalın fosfataz konjuge anti-fare	MALP521G	Biocare

Tablo 7.4: Cam, plastik ve sarf malzemeler.

Ürün	Katalog Numarası	Firma
Pozitif yüklü lam	9991001	Thermo
lamel (24 x 50)	12-540-A	Fisher
Yapışkan Film	4306311	Applied
96 kuyucuklu PCR	MLL9601	Bio-Rad
PCR tüpleri	PCR-02-C	Axygen
Ependorf Tüp	MCT-060-C, MCT-	Axygen
Pap Pen	Z672548-1EA	Sigma
Pipet ucu	BT10XL,20,200,125	Axygen
Parafilm	058.01.001	İsolab
Şale	073.01.001	İsolab
kriyotüp	89012	TPP

Tablo 7.5: Cihazlar.

Ürün	Katalog Numarası	Firma
Sentrifüj	2-6E	Sigma
qPCR makinesi	Stratagene Mx3000P	Agilent Technologies
PCR makinesi	MJ-Mini PTC1148	Bio-Rad
Nanodrop	206-26300-48	Shimadzu Biotech
Etüv	466-3510	VWR
Çalkalayıcı	S2025-B-230V	Labnet International
Sentrifüj	1-14	Sigma
Florasın mikroskobu	Eclipse 80i	Nikon
Işık mikroskobu	Eclipse, E100	Nikon
Micro pipet	F167300	Gilson
Buharlı pişirici	VC135030	Tefal
Easy Sep magnet	18000	Stem Cell Technologies
Isıtıcı blok	BSH1002-E	Benchmark
İnkübatör		VWR

8. YÖNTEM

8.1.DEKveCD138Antikorlarıyla İkili İmmünohistokimyasal Boyama

8.1.1. Deparafinizasyon ve Hidrasyon

Parafin blok haline getirilmiş kemik iliği dokularından alınan 2-3 mikron kalınlığındaki kesitler 56 °C'de 60 dk inkübe edilerek lamlara yapışmaları sağlandı. Parafinin eritilerek uzaklaştırılması ve dokulardaki su seviyesinin normal düzeye gelmesi amacıyla kesitler; ksilolde 45 dk (3x15 dk), mutlak alkol, 70%' lik , 50%'lik alkol serilerinde 15'er dk (3x5 dk) inkübe edildi. Distile suda yıkandıktan sonra kesitler 5 dk distile suda inkübe edildi.

8.1.2. Antijenlerin Açığa Çıkarılması (Antigen Retrieval)

Kesitler, içinde Borg tampon çözeltisi bulunan şaleye alındı ve şale 45 dakikaya ayarlanmış olan buharlı pişiricide inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kesitlerin içinde bulunduğu şale oda ısısında 20 dk soğumaya bırakıldı. Kesitler distile suda yıkanarak TBS'te 5 dk inkübe edildi. Damlatılacak olan solüsyonların bütün lama yayılmasını önlemek amacıyla kesitlerin çevresi hidrofobik özellikte olan bir kalem ile çizildi.

8.1.3. CD138 ve DEK Antikorları ile İkili Boyama

Dokularda bulunan endojen peroksin inaktive edilmesi için, kesitler 3%'lük hidrojen peroksit solüsyonuyla 15 dk inkübe edildikten sonra TBS'te yıkandı. Ardından sırasıyla, VanGogh antikor sulandırma çözeltisi ile 1/60 oranında sulandırılmış olan 100 µl DEK antikoruyla (60 dk), HRP-konjuge sekonder anti-fare antikoruyla (30 dk) ve 40 µl 3,3'Diaminobenzidine (DAB) kromojen ve 800 µl DAB substrattan oluşan karışımla (100 µl) 10 dk inkübasyon uygulandı. Bu aşamalar sonucunda DEK ile hücre çekirdeğinde kahverengi boyanma oluştu. CD138 antikoru ile boyamaya devam etmeden önce, bu aşamaya kadar uygulanmış olan antikorları

uzaklaştırmak amacıyla 1 birim A solüsyonu ve 3 birim B solüsyonu kullanılarak hazırlanmış olan denatüre edici solüsyonla (100 µl) 5 dk inkübe edilen kesitler (bu aşamada inkübasyon süresinin 5 dakikayı aşmamasına dikkat edildi) TBS ile (3x5 dk) yıkandıktan sonra VanGogh antikor sulandırma çözeltisi ile 1/400 oranında sulandırılmış olan 100 µl CD138 antikoruyla 60 dk inkübe edildi. Ardından sırasıyla, ALP(alkalin fosfataz)-konjuge sekonder anti-fare antikoruyla (30 dk) ve 9,6 µl Warp Red kromojen ve 750 µl Warp Red substrattan oluşan karışımla (100 µl) 10 dk inkübasyon uygulandı. Aksi belirtilmedikçe, tüm inkübasyonlar oda sıcaklığında gerçekleştirildi ve her aşamadaki inkübasyon sonrasında TBS'le 3 kez 5'er dakika yıkama işlemi uygulandı.

İmmunohistokimyasal boyama sonucunda, DEK ile elde edilmiş olan kahverengi nükleer boyanmaya ilave olarak, CD138 antikorı ile hücre yüzeyinde kırmızı-pembe renkte boyanma elde edilmiş oldu.

8.1.4. Hematoksilen Boyaması

İmmunohistokimyasal boyamanın ardından, kesitler Gill's Hematoksilen ile 3 dk inkübe edildi. Distile su ile yıkandıktan sonra %1'lik amonyak çözeltisinde 20-30 sn bekletilen kesitler tekrar distile suda yıkandı. DEK antikorı ile kahverengi olarak boyanmış hücre çekirdeklerinde hematoksilen ile boyanma gözlenmezken, DEK ile boyanmayan hücre çekirdeklerinde mavi renkte boyanma elde edilmiş oldu. Hematoksilen ile boyama sonucunda, antikorlarla çekirdek boyanması olmayan hücreler net olarak tespit edilmiş oldu.

8.1.5. Dehidrasyon ve Kapama

Dokulardaki suyun uzaklaştırılması amacıyla kesitler, %50'lik, %70'lik ve mutlak alkol serilerinde 15'er dk (3x5 dk), ardından ksilolde 45 dk (3x15 dk) inkübe edildi. Kesitler, oda sıcaklığında 1 dk kurumaya bırakıldıktan sonra ecomount kapatma maddesi damlatılarak lamel ile kapatıldı.

8.2. CD138 Pozitif ve Negatif Kemik İliği Hücrelerinin İzolasyonu

CD138^{pozitif} ve CD138^{negatif} kemik iliği hücrelerinin izolasyonu için, Vanderbilt Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji A.B.D.'na tanı amacıyla gelen vakalara ait taze kemik iliği örnekleri veya daha önce MM tanısıyla sıvı azotta dondurulmuş kemik iliği örnekleri kullanıldı. Çalışma için gerekli etik kurul kararı, projemiz kapsamında ortak çalışma yürüttüğümüz Yrd. Doç. Dr. Annette Kim tarafından Vanderbilt Üniversitesi Etik Kurul'undan (IRB) sağlandı.

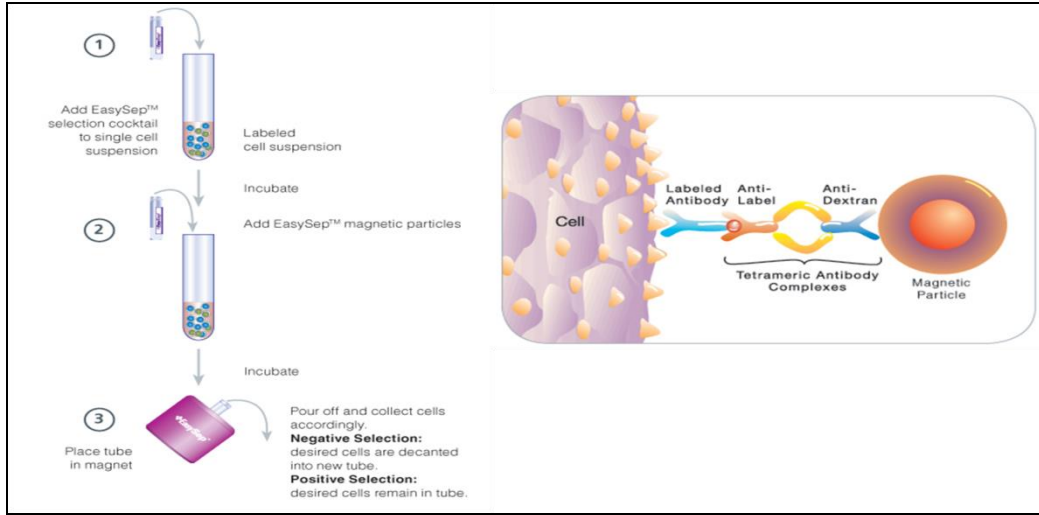
8.2.1. Kemik İliği Hücrelerinden Eritrositlerin Uzaklaştırılması

Taze kemik iliği örnekleri 50 ml'lik falkon tüpüne aktararak kemik iliği örneğinin miktarı belirlendi ve miktarının 10 katı oranında ACK (Amonyum Klorür Potasyum) lysis tampon çözeltisi eklendi. Tüp aralıklı olarak alt üst olacak şekilde çevirilerek 5 dk oda ısısında inkübe edildi ve 500 g'de 10 dk santrifüj edilerek sıvı kısım uzaklaştırıldı. Pellet, RPMI ve % 10 FBS içeren yıkama tamponu ile yeniden süspanse hale getirildi ve 200 g'de 10 dk santrifüj edilerek sıvı kısım uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandı ve hücreler sulandırıldıktan sonra trypan blue boyası ile boyanarak sayıldı.

8.2.2. EasySep Yöntemi ile Hücrelerin Ayırıştırılması

Taze kemik iliği örnekleri ACK lysis yöntemi ile eritrositlerinden ayırıştırıldıktan hemen sonra; MM tanısı ile doku bankasında daha önce dondurularak arşivlenmiş olan kemik iliği örnekleriye sıvı azot tankından alınıp çözöldükten sonra total hücre sayısı belirlendi. CD138^{pozitif} ve CD138^{negatif} hücrelerin ayırıştırılması için CD138 Positive Selection Kit ve EasySep™ Magnet kullanıldı. İzolasyon sırasında Şekil 8.1'de şematize edilmiş olan yöntem kitte belirtilen şekilde takip edildi [Web 2, 2014]. Taze kemik iliğinden izole edilen hücreler, daha sonra DNA ve RNA izole etmek amacıyla, bir gece -80°C'de izopropanol içeren hücre dondurma kabında saklandıktan sonra hücreler sıvı azot tankının buhar fazında depolandı. Doku bankası örneklerinden izole edilen hücrelerse hemen DNA ve RNA izolasyonları için kullanıldı. Taze dokulardan elde edilen hücrelerin önce dondurulup

ardından DNA ve RNA izole edilmesiyle, tüm örnekler eşit muamele edilmiş oldu ve dondur-çöz işlemi sırasında oluşabilecek etkiler her iki grup örnekte de eşitlenmiş oldu. İzole edilen hücrelerin saflığı, izolasyon sonrasında hücre sayısı yeterli olan vakalarda, CD138, CD38 ve CD45 antikorları kullanılarak akım sitometrisi (FACS) ile analiz edildi.



Şekil 8.1: EasySep yöntemi ile hücre izolasyonu

8.3. Taze Hücrelerin Sıvı Azotta Saklanması

Saklanması gereken taze hücreler, 200'g de 10 dk sentrifüj edildi ve maksimum 25×10^6 hücre/ml olacak şekilde FBS ve %20 DMSO içeren 500 µl dondurma çözeltisi içinde süspanse edildi. Bu süspansiyon, 500 µl RPMI içeren 2 ml'lik cryo tüplere alındıktan sonra izopropanol içeren hücre dondurma kabında bir gece -80 °C'de saklandı ve ardından sıvı azot tankının buhar fazında depolandı. Çözülmesi gereken sıvı azotta dondurulmuş hücreler, 37°C'deki su banyosunda yaklaşık 1dk inkubasyon sonucunda yarı çözülmüş hale getirildi ve hücre süspansiyonu 15 ml'lik falkon tüpe alındı. DMSO'yu uzaklaştırmak amacı ile üzerine su banyosunda bekletilmiş ılık haldeki RPMI ve %10 FBS içeren yıkama tamponundan 10 ml eklenerek 1000 g'de 5 dk sentrifüj edildi ve canlı ve ölü hücreler trypan blue boyası ile boyanarak sayıldıktan sonra gerekli analizlerde kullanıldı.

8.4. RT-qPCR

8.4.1.RNA İzolasyonu

8.4.1.1.Parafin Blok Örneklerinden Total RNA İzolasyonu

İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji A.B.D. arşivinden seçilen parafin bloklardan mikrotom cihazı kullanılarak her blok için 4'er tane 20 mikron kalınlıkta (toplam 80 mikronluk) kesitler alındı. RNA izolasyonu için Ambion RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit'i kullanıldı. İzolasyon sırasında kitte belirtilen yöntem takip edildi ve izolasyonun son aşamasında 30 µl nükleaz içermeyen su (nuclease free water) ile izole edilen RNA örneklerinin nanodrop cihazıyla miktar ve kalite tayini yapıldı. RNA'lar -80 °C'de saklandı. İTF Patoloji A.B.D'den alınan örnekler Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde analiz edilmiş olup, çalışma için gerekli etik kurul kararı İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul'undan alınmıştır (2012/1045-1131 dosya numarası ile 29.06.2012 tarihli 12 sayılı toplantı; 1389 no'lu karar yazısı).

8.4.1.2. Taze veya Dondurulmuş Kemik İliği Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu

Bu amaçla mirVana™ miRNA Isolation Kit'i kullanıldı. İzolasyon sırasında kitte belirtilen yöntem takip edildi ve izolasyonun son aşamasında 30 µl nükleaz içermeyen su ile izole edilen RNA örneklerinin nanodrop cihazıyla miktar ve kalite tayini yapıldı. RNA'lar -80 °C'de saklandı.

8.4.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için 100 ng total RNA ve High capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit'i kullanıldı. Kitte belirtilen yöntem takip edilerek, rastgele (random) primerlerin uygun sıcaklıkta RNA iplikçiklerine bağlanması ile ters transkriptaz (reverse transcripase) varlığında toplam 20 µl hacimde, cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezi için Biorad CFX96 cihazı 25°C'de 10 dk, 37°C'de

120 dk ve 85°C’de 5 dk olacak şekilde ayarlandı. cDNA örnekleri -20 °C’de saklandı.

8.4.3. RT-qPCR Yöntemi

Örnekler 3 tekrarlı (triplicate) olarak çalışıldı ve her bir tekrar için 10 µl 2X Taqman Universal Master Mix, 7 µl nükleaz içermeyen su, 1 µl primer/probe karışımı (DEK Hs00180127_m1, ACTB Hs01060665_g1, ABL1 Hs01104728_m1; Applied Biosystems) ve 2 µl cDNA örneği kullanıldı.

İTF, Patoloji A.B.D’den alınan parafin blok kesitlerinden elde edilen cDNA’ların RT-qPCR cihazında, 50°C’de 2 dk, 95°C’de 10 dk’lık inkübasyonun ardından, toplam 40 döngü olacak şekilde denatürasyon için 95°C’de 15 sn, primer bağlanması ve uzaması için 60°C’de 1 dk’lık inkübasyon sürelerini içeren program uygulanarak gerçekleştirildi. *DEK* geni ve referans gen olarak kullanılan *B-ACTIN* (ACTB) ve *ABL1* genleri için standart eğri oluşturmak amacıyla, bu genleri eksprese eden U937 hücre hattından elde edilen RNA’dan cDNA sentezlendi. Sulandırılmamış, 2 µl U937-cDNA’sı “1. Standart (St 1)” olarak kullanıldı (en fazla miktarda *DEK*, *ACTB* ve *ABL1* mRNA’sı içeren standart) ve bu standart için “2” sayısal değeri seçildi. Ardından aşağıdaki seri-sulandırmalar yapılarak standartlar ve bu standartlara karşılık gelen sayısal değerler belirlendi:

- St 1: sulandırılmamış U937-cDNA’sı (sayısal değer 2)
- St 2: 1/5 oranında sulandırılmış “St 1” (sayısal değer $2/5=0.4$)
- St 3: 1/5 oranında sulandırılmış “St 2” (sayısal değer $0.4/5=0.08$)
- St 4: 1/5 oranında sulandırılmış “St 3” (sayısal değer $0.08/5=0.016$)
- St 5: 1/5 oranında sulandırılmış “St 4” (sayısal değer $0.016/5=0.0032$)
- St 6: 1/5 oranında sulandırılmış “St 5” (sayısal değer $0.0032/5=0.00064$)
- St 7: 1/5 oranında sulandırılmış “St 6” (sayısal değer $0.00064/5=0.000128$)

Her RT-qPCR reaksiyonunda elde edilen standart eğri grafiğinde, analiz edilen örneklerin Y ekseninde yer alan Ct (threshold cycle) değerine X ekseninde karşılık gelen “standart değer” o genin ekspresyon seviyesini belirledi. Bir örnekteki *DEK* ekspresyon seviyesi değeri aynı örneğin referans gen ekspresyon seviyesi değerine

bölünerek (*DEK/ACTB* veya *DEK/ABL1*) normalize edilmiş *DEK* ekspresyon seviyesi elde edildi.

Vanderbilt Üniversitesi'ne ait örnekler Dr. Anette Kim'in laboratuvarında çalışıldı. RT-qPCR reaksiyonları için Biorad CFX96 cihazında, 50°C'de 2 dk, 95°C de 10 dk'lık inkübasyonun ardından, toplam 40 döngü olacak şekilde denatürasyon için 95°C'de 15 sn, primer bağlanması ve uzaması için 60°C'de 1 dk'lık inkübasyon sürelerini içeren program kullanıldı. Yapılan RT-qPCR'da *ACTB* geni referans olarak kullanıldı. RT-qPCR reaksiyonu sonucu *DEK* geni ve *ACTB* için ayrı ayrı elde edilen Ct (threshold cycle) değerleri bu genler için ekspresyon seviyeleri olarak kabul edildi. Bir örnekteki *DEK* ekspresyon seviyesi değerinden aynı örneğin referans gen ekspresyon seviyesi çıkarıldı (*DEK-ACTB*) ve her bir örnek için ΔCt değeri hesaplandı. Ardından her bir örneğin ΔCt değerinden kalibratör olarak belirlenen kontrol örneğin ΔCt değeri çıkarılarak $\Delta\Delta Ct$ değeri hesaplandı. $2^{-[\Delta\Delta Ct]}$ formülü kullanılarak gen ifadelerindeki değişim "kat artış" veya "kat azalış" şeklinde hesaplandı.

8.5. qPCR

8.5.1. DNA İzolasyonu

Vanderbilt Üniversitesi'ne ait taze veya dondurulmuş kemik iliği örneklerinden (sağlıklı veya MM tanısı almış) izole edilen CD138^{pozitif}, CD138^{negatif} hücreler ve total kemik iliği hücrelerinden DNA izolasyonu için QIAamp DNA Blood Mini Kit kullanıldı. İzolasyon sırasında kitte belirtilen yöntem takip edildi. 40 µl nükleaz içermeyen su ile izole edilen DNA'lar -80 °C'de saklandı.

8.5.2. qPCR Yöntemi ile *DEK* Geninin Kopya Sayısının Belirlenmesi

Örnekler 3 tekrarlı olarak çalışıldı ve her bir tekrar için 10 µl 2X Taqman Universal Master Mix, 4 µl nükleaz içermeyen su, 1 µl *DEK* primer/probe karışımı, 1 µl RNaseP primer/probe karışımı (genomda iki kopya içeren referans gen) , ve 4 µl (total 20 ng) DNA örneği kullanıldı. PCR reaksiyonu Biorad CFX96 cihazında, 50°C'de 2 dk , 95°C'de 10 dk inkübasyon ardından, 40 döngü olacak şekilde

denatürasyon için 95°C’de 15 sn ardından primer bağlanması ve uzaması için 60°C’de 1 dk’lık program uygulanarak gerçekleştirildi. RT-qPCR reaksiyonu sonucu DEK geni ve RNaseP için ayrı ayrı elde edilen Ct (threshold cycle) değerleri bu genler için ekspresyon seviyeleri olarak kabul edildi. Bir örnekteki *DEK* ekspresyon seviyesi değerinden aynı örneğin referans gen ekspresyon seviyesi çıkarıldı (*DEK*-RNaseP) ve her bir örnek için ΔCt değeri hesaplandı. Ardından her bir örneğin ΔCt değerinden kalibratör olarak belirlenen kontrol örneğin ΔCt değeri çıkarılarak $\Delta\Delta Ct$ değeri hesaplandı. $2^{[-\Delta\Delta Ct]}$ formülü kullanılarak gen ifadelerindeki değişim “kat artış” veya “kat azalış” şeklinde hesaplandı.

8.6. İstatistiksel Analiz

Analizler için Graphpad Prism 6 programındaki (GraphPad Software, Inc.) unpaired t-test/Mann-Whitney testi kullanıldı. P değeri 0.05’in altında olan değerler anlamlı kabul edildi.

9.BULGULAR

9.1.ParafinBlok Örneklerinde *DEK* mRNA Ekspresyonunun Belirlenmesi

MM hastalarındaki *DEK* mRNA ekspresyonunun belirlenebilmesi için yürüttüğümüz ilk çalışmamızda, İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji A.B.D’de formalinle fiske edildikten sonra parafin blok haline getirilmiş olan MM (n=30) ve normosellüler özellik gösteren kontrol kemik iliği (n=8) dokularından izole edilen RNA’lar RT-qPCR yöntemiyle, standart eğri metodu kullanılarak incelendi (Tablo 9.1). *DEK* geninin ekspresyonunun normalize edilmesi için, daha önce literatürde MM hasta örneklerinin analizinde kullanılmış olan iki farklı house keeping geni (*ABL1* ve *ACTB*) referans olarak kullanıldı [Beillard et al., 2003], [Ling et al., 2012]. *ABL1*, *ACTB* ve *DEK* genleri için elde edilen standart eğri grafikleri sırasıyla Şekil 9.1 , 9.2 ve Şekil 9.3’de gösterilmektedir.

Yapılan RT-qPCR analizi sonucunda, tüm hasta ve kontrol örneklerinde referans olarak kullanılan *ACTB* ve *ABL1* genlerinin eksprese olduğu gözlemlendi (örneklerde referans gen ekspresyonunun gözlenmemesi muhtemelen yetersiz RNA’dan veya yetersiz cDNA sentezinden kaynaklanmaktadır). Analiz edilen 30 hastadan birinin klinik evresi bilinmemekte olup, *DEK* ekspresyonu gözlenmeyen (*DEK* Ct değeri 40 veya üzerinde olan) hastaların tamamı “III. Evre” klinik tanısı almış hastalardı (Tablo 9.2). Normalize edilmiş *DEK* ekspresyon değerlerinin (*DEK/ABL1* ve *DEK/ACTB*) grafikleri Şekil 9.4’de gösterildi (*DEK* ekspresyonu gözlenmeyen örneklerde normalize edilmiş *DEK* değeri sıfır “0” olarak kabul edildi). RT-qPCR sonuçlarının istatistiksel analizi sonucunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MM hastalarında *DEK* mRNA ekspresyonunun anlamlı oranda azaldığı tespit edildi (*DEK/ABL1* P=0.0014; *DEK/ACTB* P=0.0116) (Şekil 9.5).

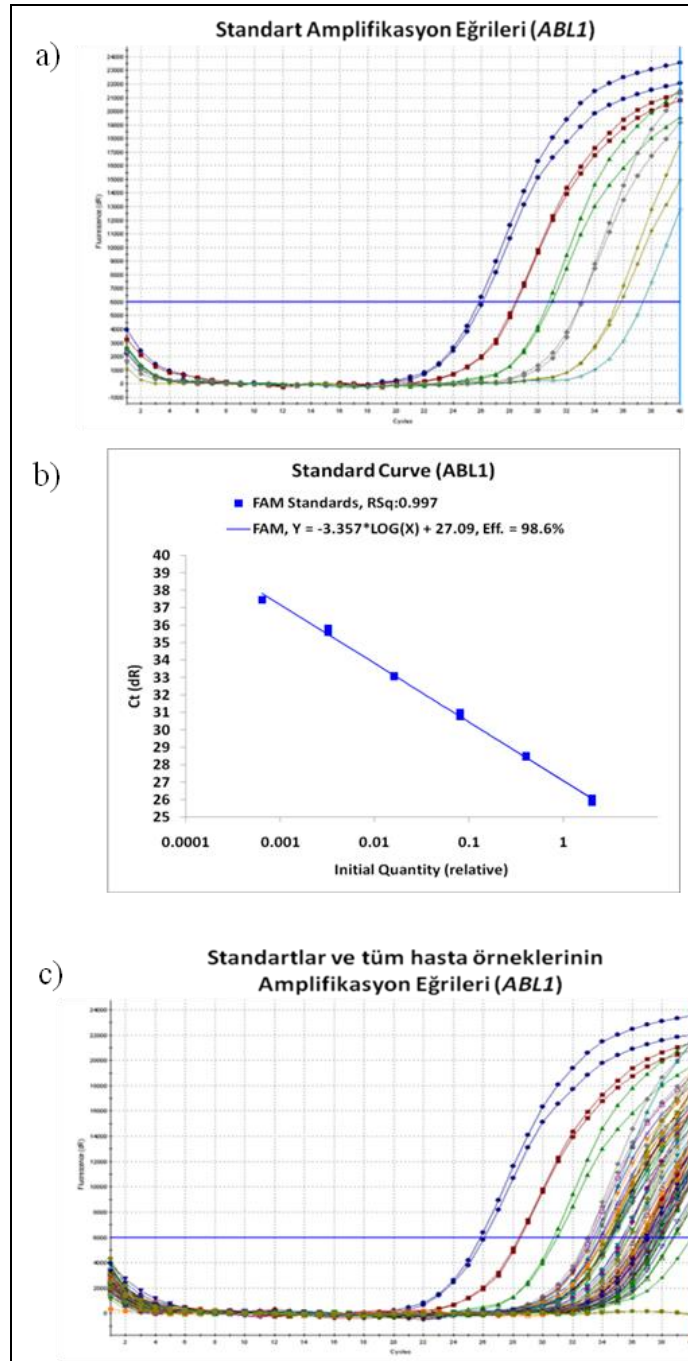
RT-qPCR yöntemiyle analiz ettiğimiz MM ve sağlıklı kemik iliklerinin parafine gömülmüş dokularından alınan kesitler, laboratuvarımızda yüksek lisans eğitimini tamamlayan Ahmet Özdilek’in tez projesi kapsamında immunohistokimya (İHK) yöntemi ile incelendi ve hücre yüzeyinde yerleşim gösteren plazma hücre belirteci (marker) CD138 ve hücre çekirdeğinde yerleşim gösteren *DEK* proteinlerinin ekspresyon seviyesi belirlendi. İHK inceleme sonuçları, *DEK*’in

sağlıklı ve MM hastalarının kemik iliğindeki miyeloid ve eritroid seri hücrelerinde hücre çekirdeğinde eksprese edildiğini gösterdi. Ancak, MM hastalarının CD138^{pozitif} neoplastik plazma hücrelerinde ya da normal kemik iliğinde bulunan CD138^{pozitif} plazma hücrelerinde İHK yöntemiyle tespit edilebilecek düzeyde DEK proteininin eksprese olmadığı belirlendi.

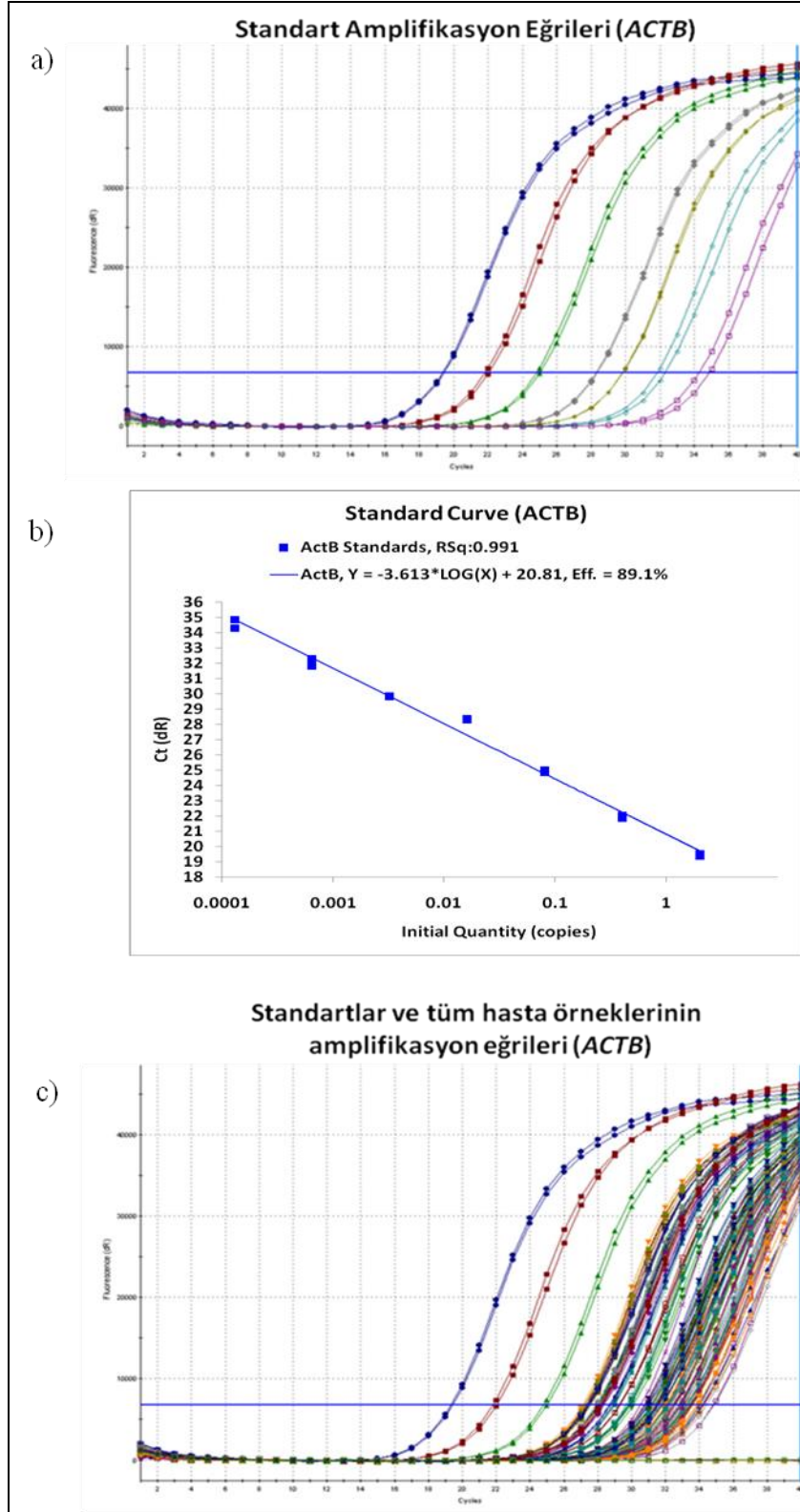
Tablo 9.1: Kemik iliği örneklerinin alındığı vakaların klinik özellikleri ve normalize edilmiş *DEK* mRNA ekspresyonu seviyeleri. (No:1-8 kontrol; No: 9-38 MM).

No	Protokol #	Cins.	Yaş	Evre	K.İ. Tutulum	RT-qPCR Normalizasyonu	
						DEK/ACTB	DEK/ABL1
1	38778/12	E	73			3.13	4.15
2	37167/12	E	73			1.51	1.73
3	39077/12	E	65			0.51	0.55
4	39051/12	E	45			0.39	0.60
5	39014/12	K	57			0.35	0.56
6	39046/12	E	78			0.52	1.02
7	38574/12	E	62			0.37	0.28
8	38506/12	K	36			0.74	0.74
9	35811/07	E	69	2A	İnt.& Nod.	0.35	0.39
10	9109/07	K	80	1A	İnt.&Yama	1.00	0.84
11	37058/07	K	73	2A	İnt.&Yama	0.76	0.60
12	14280/07	K	72	2A	İnt.&Yama	0.91	2.35
13	35803/07	K	64	2A	Nod.	1.81	1.72
14	35073/06	K	76	2A	İnt.	0.42	0.19
15	25925/07	E	64	2A?	Diffüz	3.01	1.33
16	16816/06	E	58	2A?	Diffüz	0.47	0.37
17	34787/05	E	54	3A	Nod.& Dif.	0.28	0.11
18	33960/05	K	51	3A	İnt. & Yama	0.37	0.10
19	12938/07	K	57	3A	İnt. & Yama	0.23	0.28
20	16453/05	E	57	3A	İnt. & Yama	0.00	0.00
21	31924/04	K	60	3A	İnt. & Dif.	0.00	0.00
22	27247/06	K	58	3A	İnt & Yama	0.00	0.15
23	16329/05	E	61	3A	İnt.	0.16	0.20
24	38447/07	E	72	3A	Diffüz	0.29	0.11
25	19330/07	K	66	3A	Diffüz	0.00	0.00
26	22027/06	K	51	3B	Diffüz	0.00	0.00
27	27319/06	E	50	3B	Yama&Nod	0.00	0.00
28	9382/07	E	49	3B	Diffüz	1.28	0.72
29	18857/06	E	60	3A?	Yama & İnt.	0.00	0.00
30	29801/04	E	76	3B	Yama & İnt.	0.00	0.00
31	37060/07	K	64	3B	Yama & İnt.	0.10	0.13
32	2544/07	K	63	3B	İnt.	0.14	0.16
33	36391/05	E	54	3B	Nod.&İnt.	0.00	0.00
34	21872/06	E	55	?	Diffüz	0.44	0.21
35	38410/07	K	62	3A	İnt.	0.39	0.41
36	3208/08	E	62	3B	Yama&İnt	0.00	0.00
37	21148/07	K	78	3A	Yama & İnt.	0.00	0.00
38	29820/04	E	75	3A	Diffüz	0.00	0.00

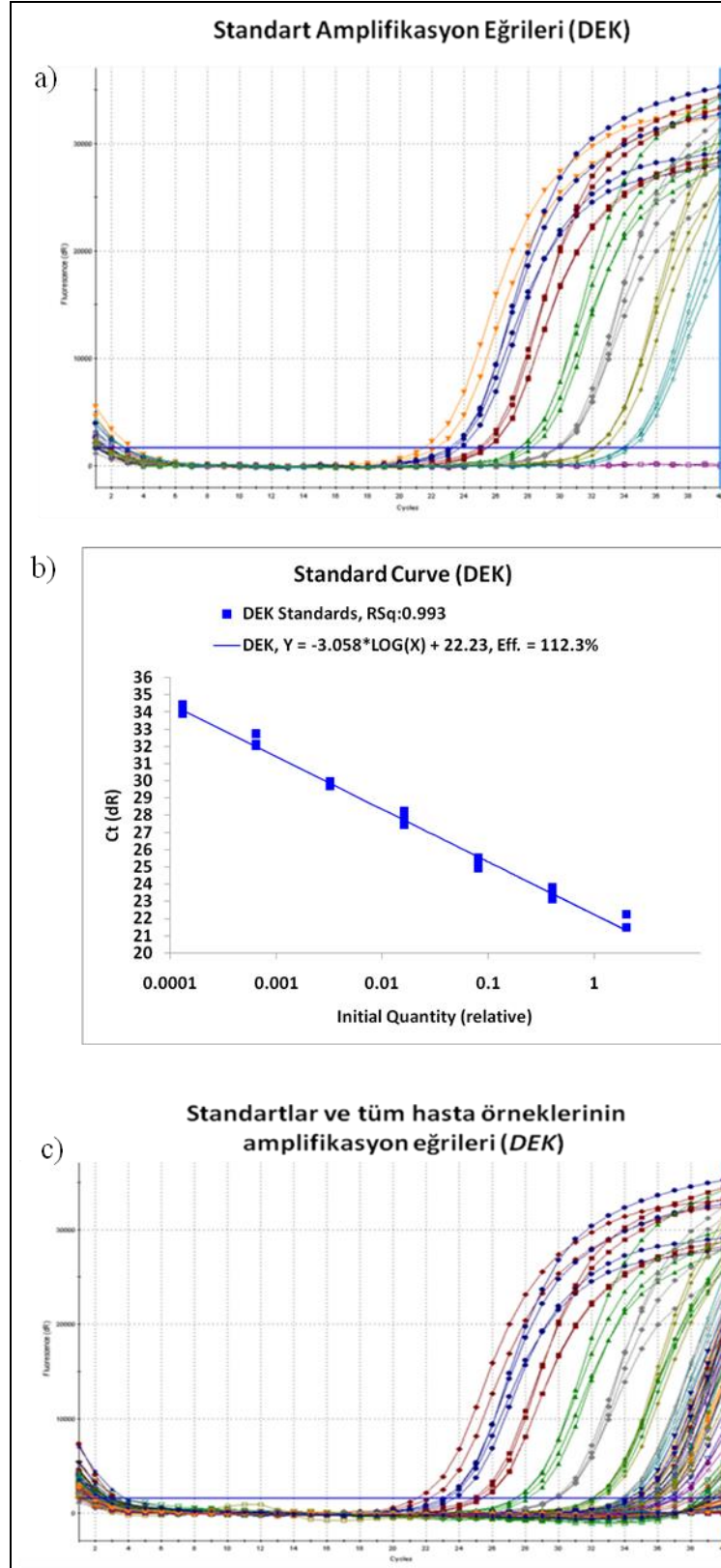
*Cins.: Cinsiyet, K.İ.; Kemik İliği, İnt.; İnterstiyel, Dif.; Diffüz, Nod.; Nodüler.



Şekil 9.1: *ABL1* geni için parafin blok örnekleri kullanılarak elde edilen RT-qPCR analiz sonuçları. a) amplifikasyon eğrileri, b) standart eğri grafiği, c) standartlar ve tüm hasta örneklerinin amplifikasyon eğrileri. *ABL1* geni için kullanılan seri olarak sulandırılmış standartlardan elde edilen PCR a) amplifikasyon eğrileri ve bu amplifikasyon eğrisinde cihaz tarafından belirlenmiş otomatik cycle threshold (Ct) değerleri kullanılarak cihazdaki software ile hesaplanmış olan b) standart eğri grafiği gösterilmiştir. Amplifikasyon eğrilerinin bulunduğu üst paneldeki şekilde yer alan mavi yatay düz çizgi, standart olarak kullanılan örneklerin Ct değerini tespit etmektedir. Alt paneldeki standart eğri grafiğinde belirtilen R²(R²): 0.997.



Şekil 9.2: *ACTB* geni için parafin blok örnekleri kullanılarak elde edilen RT-qPCR analiz sonuçları. a) amplifikasyon eğrileri, b) standard eğri grafiği, c) standartlar ve tüm hasta örneklerinin amplifikasyon eğrileri. Şekil 9.1’de açıklandığı şekilde *ACTB* için elde edilen amplifikasyon eğrileri ve standart eğri grafikleri. *ACTB* standartları için Rsq:0.991.

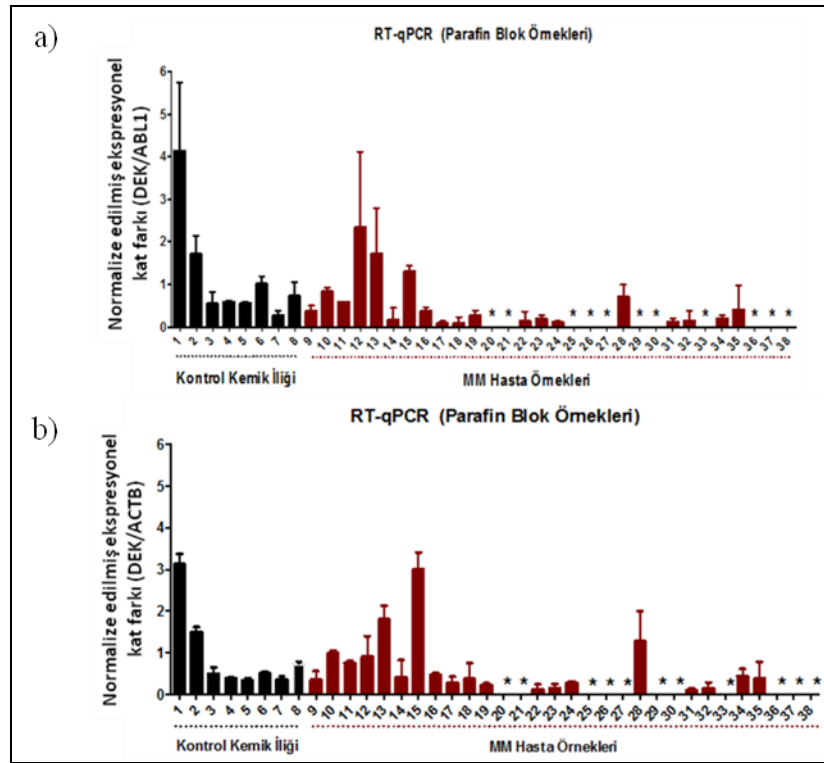


Şekil 9.3: *DEK* geni için parafin blok örnekleri kullanılarak elde edilen RT-qPCR analiz sonuçları. a) amplifikasyon eğrileri, b) standard eğri grafiği, c) standartlar ve tüm hasta örneklerinin amplifikasyon eğrileri. *DEK* standartları için Rsq:0.993.

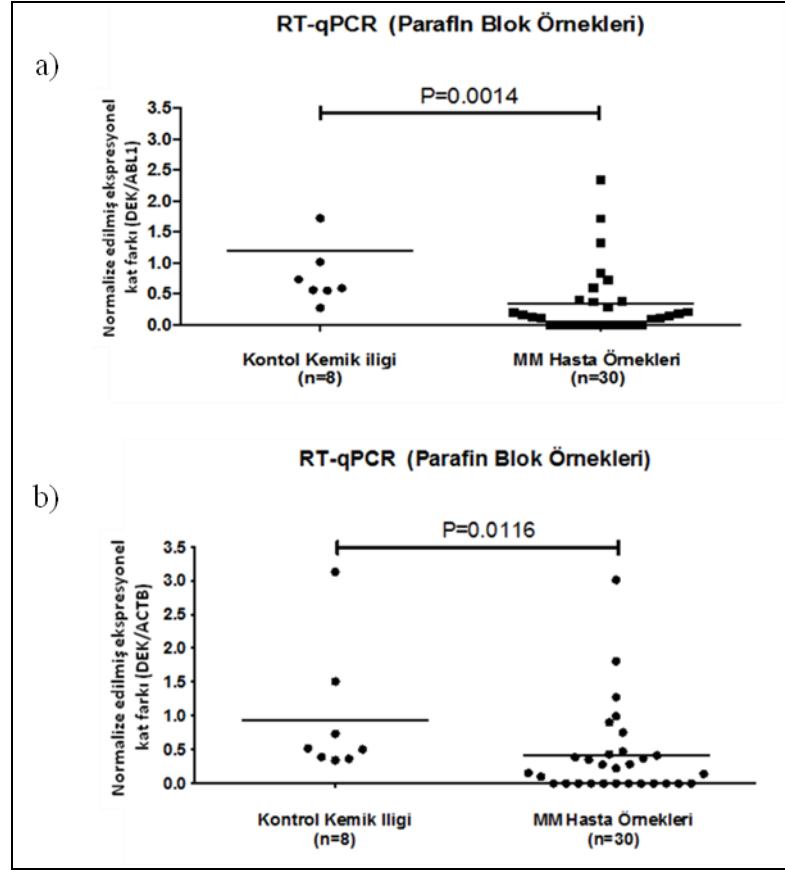
Tablo 9.2: RT-qPCR incelemesinde *DEK* ekspresyonu gözlenen ve gözlenmeyen vakaların klinik evreye göre (MM evre I, II ve III) dağılımı.

RT-qPCR (parafin blok dokuları)							
Evre I (n=1)		Evre II (n=7)		Evre III (n=21)		Sağlıklı (n=8)	
<i>DEK</i> (+)	<i>DEK</i> (-)	<i>DEK</i> (+)	<i>DEK</i> (-)	<i>DEK</i> (+)	<i>DEK</i> (-)	<i>DEK</i> (+)	<i>DEK</i> (-)
n=1	n=0	n=7	n=0	n=9	n=12	n=8	n=0

**DEK* (+): *DEK* ekspresyonu Ct değeri 40'ın altında olan vakalar. *DEK* (-): *DEK* ekspresyonu Ct değeri 40 veya 40'ın üzerinde olan vakalar.



Şekil 9.4: Parafin blok örneklerinde *DEK* mRNA ekspresyonu. a) *ABL1* geni ile normalize edilmiş *DEK* ekspresyon seviyesi, b) *ACTB* geni ile normalize edilmiş *DEK* ekspresyon seviyesi. **DEK* ekspresyonu gözlenmeyen (Ct≥40) vakalar.



Şekil 9.5: *DEK* geni RT-qPCR sonuçlarının Mann-Whitney istatistik analizi. a) *ABL1* referans geni ile, b) *ACTB* referans geni ile normalize edilmiş RT-qPCR sonuçları.

Tezimizde elde ettiğimiz RT-qPCR sonuçları ve Ahmet Özdilek'in İHK verileri birlikte değerlendirildiğinde, RT-qPCR analizinde kullandığımız RNA örneklerinin total kemik iliği parafin blok kesitlerinden elde edilmiş olması nedeniyle, kemik iliğinde bulunan yüksek *DEK* ekspresyonuna sahip hücrelerin oranının ($CD138^{\text{negatif}}$ olan ve ağırlıklı olarak miyeloid ve eritroid seri hücreleri), $CD138^{\text{pozitif}}$ MM hücrelerindeki azalmış *DEK* ekspresyonunun RT-qPCR'la tespitini maskeleyebileceği sonucuna varıldı. Aynı sebeple, *DEK* geninin kopya sayısının da parafin bloklardan elde edilen DNA örneklerinde güvenilir şekilde tespitinin mümkün olmayacağına karar verildi.

9.2. Taze veya Dondurulmuş Kemik İliği Hücrelerinden Ayırıştırılan CD138^{pozitif} ve CD138^{negatif} Hücrelerdeki DEK Ekspresyonu ve DEK Geni Kopya Sayısının Belirlenmesi

Parafin blok örneklerinden elde edilen veriler doğrultusunda, *DEK* ekspresyonu ve kopya sayısının belirlenebilmesi için taze ya da dondurulmuş kemik iliği örneklerinin kullanılmasına karar verildi. Bu amaçla, Amerika Birleşik Devletleri, Nashville’de bulunan Vanderbilt Üniversitesi öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Annette Kim’le ortak çalışma yürütüldü ve çalışmamız için gerekli olan etik kurul kararı Dr. Kim tarafından Vanderbilt Üniversitesi’nden temin edildi. Aşağıda bulguları verilen Vanderbilt Üniversitesi MM hastalarının (n=41) analizleri, Haziran 2013 - Eylül 2013 tarihleri arasında Dr. Annette Kim’in laboratuvarı ziyaret edilerek Vanderbilt Üniversitesi’nde tarafımızca tamamlandı.

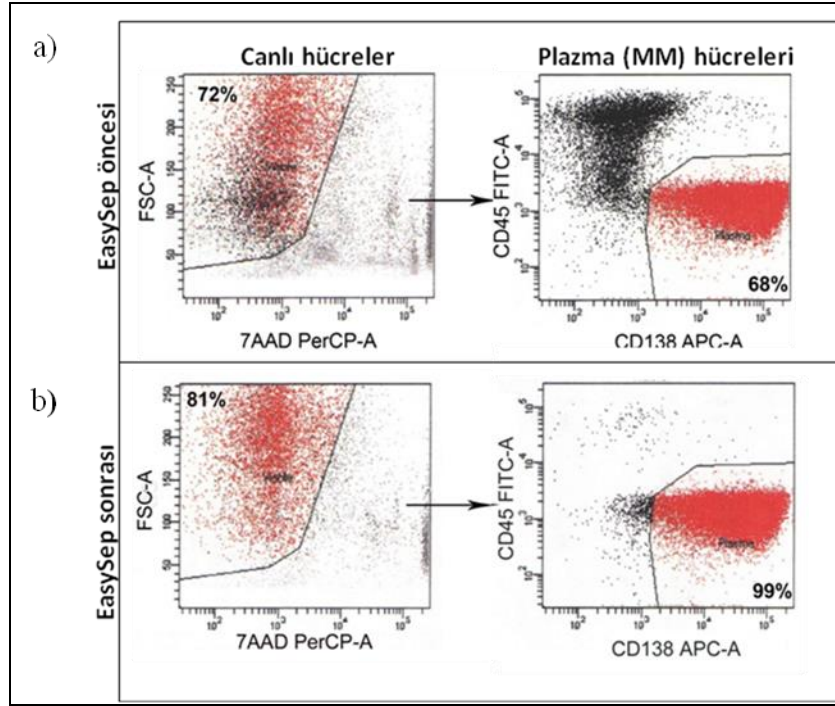
9.2.1. CD138^{pozitif} ve CD138^{negatif} Hücrelerin Ayırıştırılması

DEK ekspresyonunun kanserli MM hücrelerinde spesifik olarak tespit edilebilmesi için MM hastalarının dondurulmuş veya taze kemik iliği örneklerinden (n=41) (Tablo 9.3) CD138^{pozitif} ve CD138^{negatif} hücreler EasySep yöntemi ile izole edildi. Ancak, sağlıklı kemik iliğinde plazma hücre oranı çok düşük olduğundan (% 0.5-3 arası) yeterli miktarda CD138^{pozitif} ve CD138^{negatif} hücre elde edilemedi. Bu sebeple, 3 adet normosellüler özellik gösteren kontrol kemik iliği örneği birleştirildi ve bu birleştirilmiş total kemik iliği örneği qPCR deneylerinde kontrol olarak kullanıldı. İzolasyon sonrasında elde edilen hücrelerin saflığı, hücre sayısı yeterli olan 8 MM vakasında CD138 (kanserli ve normal plazma hücre belirteci), CD38 (plazma hücreleri ve öncü hematopoietik hücrelerin yüzeyinde eksprese olmakta) ve CD45 (genel lenfosit antijeni) antikorları kullanılarak akım sitometrisi (FACS) ile analiz edildi. FACS analizleri sonucunda, MM kemik iliği örneklerinden ayırdığımız CD138^{pozitif} hücrelerin yaklaşık %80-99 saflıkla elde edildiği tespit edildi (Tablo 9.3). Bir vakaya ait FACS analiz sonucu Şekil 9.6’da gösterildi.

Tablo 9.3: Taze veya dondurulmuş kemik iliği hücrelerinin alındığı vakalar. Klinik özellikleri, CD138^{pozitif} ve CD138^{negatif} popülasyonlardaki FACS analizi ile elde edilen CD138^{pozitif} hücre yüzdesi, CD138^{pozitif} ve CD138^{negatif} hücrelerdeki DEK ekspresyonu ve kopya sayısı.

No	D.B.#	C	Y	DEK RTq-PCR		DEK Kopya Sayısı		T. P. H. %	FACS CD138 ⁺ Hücre %		İ H K
				CD138 ⁺	CD138 ⁻	CD138 ⁺	CD138 ⁻		CD138 ⁺ P.	CD138 ⁻ P.	
	K.T.K.İ.				1*	1*	1*				
1	2			0.48	1.23	1		38.			
2	7			0.01	0.13	1.09		90	89.90	47.00	
3	37			0.08	0.75	1.05		27.	84.30	5.00	
4	38			0.25	0.72	1.04		61			
5	42			0.60	0.87	1.03		45			
6	45			0.18	0.78	1.16		21			
7	48			0.04	0.55	1.16		78	98.00	16.20	
8	59			0.02	0.64	1.03		64.			
9	91			0.03	0.40	0.86		40			
10	114			0.11	1.02	1.02		21.			
11	136			0.04	0.37	1.21		17			+
12	174			0.10	1.50	1.78	1.02	22	78.60	9.40	+
13	187			0.50	0.83	1.55	1.02	33			+
14	189			0.47	0.47	1.09		55.			
15	193			0.13	1.36	1.03		41			
16	220			0.42	0.73	0.92		30		1.9	
17	223			0.08	0.37	1.17		21.	95.10	12.70	
18	230			0.07	0.98	1.72	1.06	32.			+
19	252			0.10	0.87	1.44		41.			
20	313			0.09	1.14	0.88		22			
21	14/2			0.09	0.91	1.34		23		0.6	
22	193/2			0.12	1.03	0.96		52			
23	23/2			0.05	1.18	1.01		32.			
24	23/3			0.06	1.40	1		52.			
25	FF01	6		0.62	2.09	1.96	1.12	60	99.50	28.70	+
26	FF02	7		0.62	2.40	1.1		20			+
27	FF03	7		0.27	1.65	0.82		23	84.4	20.3	
28	FF04	E	8	0.59	0.51	0.67		7			
29	FF05	E	7	0.05	1.40	1.02		35			+
30	FF06	E	7	1.11	2.65	1.07		54			+
31	FF07	E	5	0.17	2.90	0.91		10			+
32	FF08	E		0.35	0.80	0.92		5			
33	FF09	E	6	0.54	2.81	0.96		10			+
34	FF10	E	4	0.30	1.23	1.18		10			+
35	FF11	K	5	0.26	1.14	0.89		25			
36	FF12	E	6	0.66	0.85	0.81		23			+
37	FF13	E	6	0.55	0.68	1.03		20			
38	FF14	E	5	0.77	1.41	0.88		6			
39	FF15	K	6	0.12	1.14	1.05		46.			
40	FF16	E	5	0.22	0.94	1.02		15			
41	FF17	E	6	0.08	1.45	1.24		21			

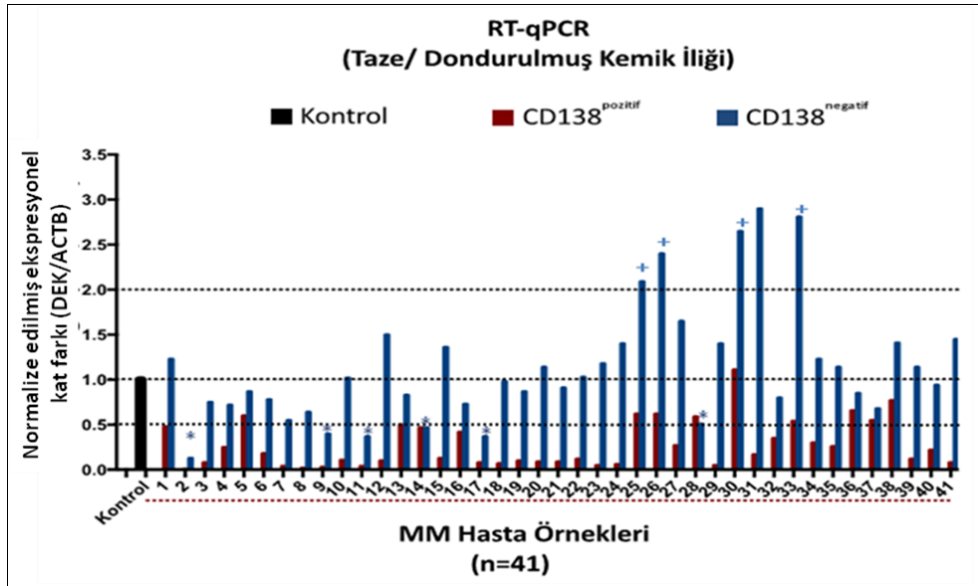
* Total kemik iliği (birleştirilmiş 3 örnek); K.T. K. İ.: Kontrol Total Kemik İliği; D.B.:Doku Bankası; k.i:kemik iliği; C.:Cinsiyet; Y.:Yaş; T.P.H:Tanıda Plazma Hücre Yüzdesi; P.:Popülasyon.



Şekil 9.6: MM hücrelerinin EasySep ile izolasyon sonucu. a) CD138^{pozitif} hücre izolasyonu öncesinde, b) CD138^{pozitif} hücre izolasyonu sonrasında FACS analizi sonucu (MM hastası, no:25). CD138 antikoruyla EasySep izolasyonu sonrasında elde edilen canlı hücrelerin (sol alt panel, kırmızı (%81)) %99'unun (sağ alt panel, kırmızı) plazma hücre belirticini (CD138) eksprese ettiği belirlendi.

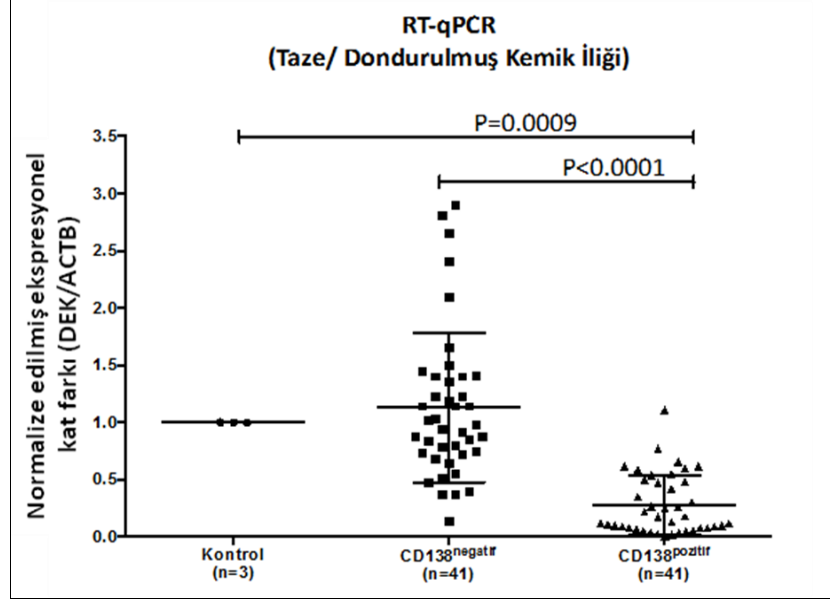
9.2.2. CD138^{pozitif} ve CD138^{negatif} MM Hücrelerinde *DEK* Ekspresyon Seviyesinin mRNA Düzeyinde Belirlenmesi

DEK mRNA ekspresyonunu tespit etmek amacıyla, MM hastalarının CD138^{pozitif} (neoplastik plazma hücreleri) ve CD138^{negatif} hücrelerinden ve kontrol total-kemik iliğinden izole edilen RNA'lar RT-qPCR'la analiz edildi. Bu analiz sonucunda, kontrol kemik iliğinde ve 41 MM vakasının 30'unda CD138^{negatif} hücrelerde (bu hücreler kontrol kemik iliğine benzer şekilde, büyük oranda miyeloid ve eritroid seri hücrelerinden oluşmaktadır) benzer seviyede *DEK* mRNA ekspresyonu gözlenirken, 5 MM vakasının CD138^{negatif} hücrelerinde kontrol kemik iliğine göre *DEK* ekspresyonunun 2-kat ve üzerinde arasında arttığı (MM no: 25, 26, 30, 31 ve 33), 6 vakada ise ekspresyonun 2-kat veya altında azaldığı (MM no: 2, 9, 11, 14, 17 ve 28) tespit edildi (Şekil 9.7).



Şekil 9.7: MM hastalarının kemik iliğinden izole edilen CD138^{pozitif} ve CD138^{negatif} hücrelerde ve kontrol kemik iliği hücrelerinde *DEK* ekspresyonunun RT-qPCR analiz sonucu. CD138^{pozitif} hücreler kırmızı sütun, CD138^{negatif} hücreler mavi sütun, kontrol kemik iliği hücreleri ise siyah sütun ile gösterilmektedir. Kontrol kemik iliği *DEK* ekspresyon değeri kalibratör olarak kullanıldı ve örneklerdeki *DEK* ekspresyon seviyesi “kontrole göre kat-değeri” olarak grafikte gösterildi. CD138^{negatif} populasyonlarında *DEK* ekspresyonunda 2-kat veya daha fazla azalma gösteren örnekler (*) ile, 2-kat veya daha fazla artış gösteren örnekler ise (+) ile gösterildi.

Analiz edilen 41 vakanın 33’ünde (%80) CD138^{pozitif} MM hücrelerindeki [neoplastik plazma hücreleri] *DEK* ekspresyonunun, aynı hastadaki CD138^{negatif} hücrelere göre 2 ile 30 kat arasında azalma gösterdiği belirlendi (Şekil 9.7). CD138^{pozitif} *DEK* mRNA ekspresyon seviyesindeki bu azalmanın, kontrol kemik iliği hücreleri ve CD138^{negatif} hücrelerle karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi (Şekil 9.8).

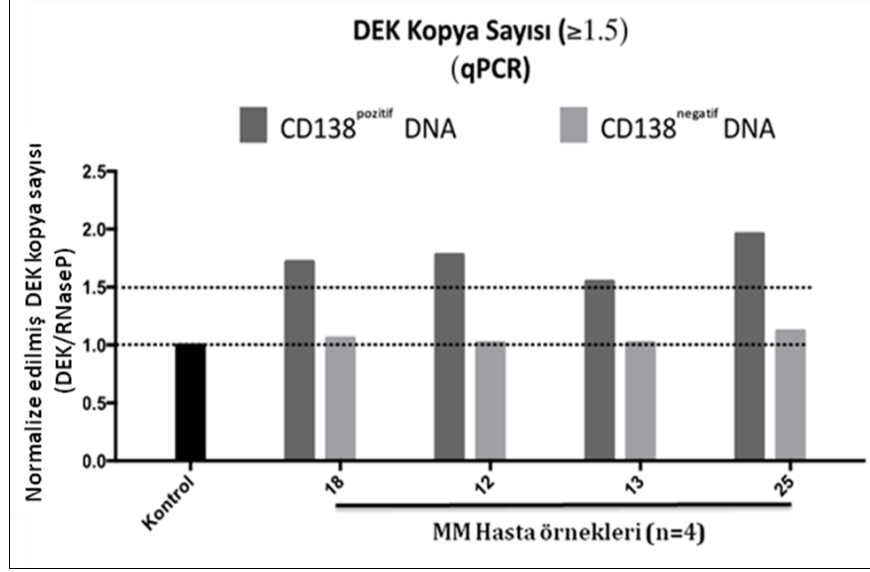


Şekil 9.8: Şekil 9.7’de gösterilen *DEK* mRNA ekspresyon sonuçlarının Mann-Whitney istatistik analizi.

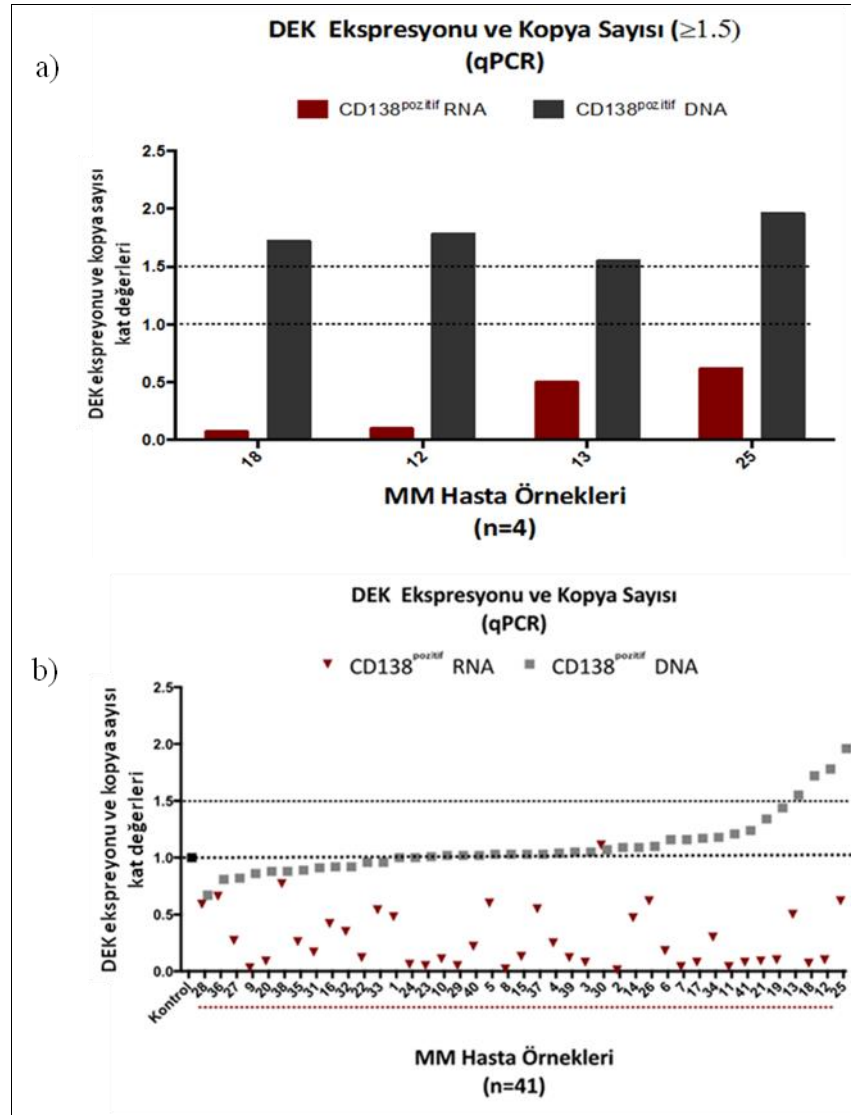
9.3. MM Hastalarında *DEK* Geni Kopya Sayısının Belirlenmesi

DEK geni kopya sayısının MM hücrelerinde spesifik olarak tespit edilebilmesi için MM hastalarından (n=41) EasySep yöntemiyle ayrıştırılan CD138^{pozitif} MM hücreleri ve normosellüler özellik gösteren 3 kontrol kemik iliği örneği bir araya getirilerek oluşturulan total kemik iliği örneğinden izole edilen DNA’lar qPCR’la analiz edildi. qPCR deneylerinde, genomda 2-kopya olarak bulunan ve literatürde sıklıkla referans gen olarak kullanılan *RNaseP* geni normalizatör olarak kullanıldı.

qPCR analizleri sonucunda, 41 MM hastasının 4’ünün CD138^{pozitif} hücrelerinde *DEK* geninin kopya sayısında kontrol kemik iliğine göre 1.5 kat (3 kopya) veya üzerinde artış gözlenirken (Şekil 9.9), bu kopya artışının aynı hücrelerdeki *DEK* mRNA ekspresyonuna yansımadığı ve ekspresyonda belirgin bir artışa sebep olmadığı tespit edildi (Şekil 9.10). Kopya sayısında artış gözlenen MM hasta örneklerinin CD138^{negatif} hücrelerindeyse kontrole benzer olarak *DEK*’in 2 kopya halinde bulunduğu görüldü (Şekil 9.9).



Şekil 9.9: Kontrol kemik iliği ve *DEK* geni kopya sayısında artış gösteren MM hastalarının CD138^{pozitif} CD138^{negatif} hücrelerinin qPCR sonucu. Kontrol kemik iliği siyah sütun, CD138^{pozitif} hücreler koyu gri sütun, CD138^{negatif} hücreler açık gri sütun ile gösterilmektedir. Normalize olmuş kontrol kemik iliğine ait *DEK* qPCR değeri kalibratör olarak kullanıldı ve *DEK* geni kopya sayısı grafikte “kontrole göre kat-değeri” olarak gösterildi.

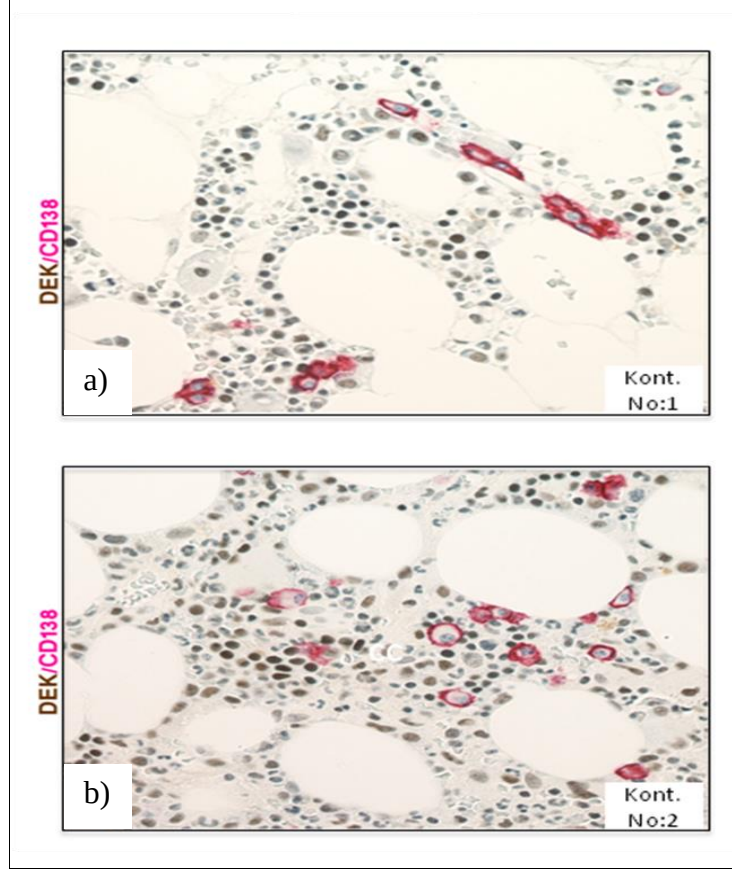


Şekil 9.10: DEK geni kopya sayısında artış gösteren ve tüm MM vakalarının DNA kopya sayısı ve mRNA ekspresyon seviyesi. a) *DEK* geni kopya sayısında artış gösteren CD138^{pozitif} MM hücrelerinin (koyu gri sütun) *DEK* mRNA ekspresyon seviyesi (kırmızı sütun). Grafikte hasta örnekleri *DEK* ekspresyonu en azdan en çoğa doğru (18, 12, 13 ve 25 no'lu örnekler) sıralanmıştır. b) Total kemik iliği (Kontrol; siyah kare) ve MM hastalarının (n=41) CD138^{pozitif} hücrelerindeki *DEK* geni kopya sayısı (gri kare) ve *DEK* mRNA ekspresyon seviyesi (kırmızı ters üçgen).

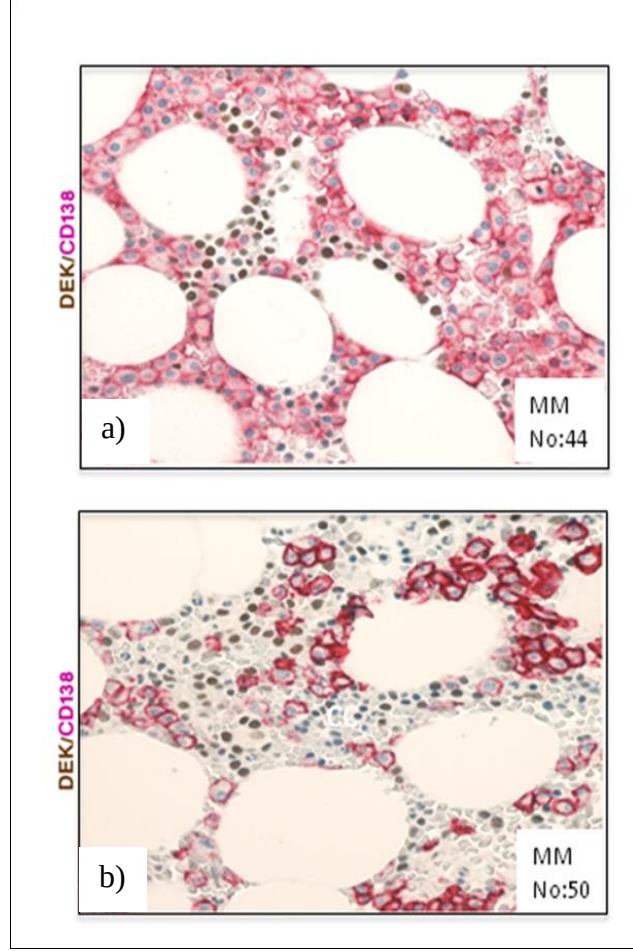
9.4. DEK Ekspresyon Seviyesinin İmmunohistokimyasal Yöntemle Protein Düzeyinde Tespit Edilmesi

Taze ya da dondurulmuş kemik iliği örnekleri kullanılarak qPCR yöntemiyle *DEK* geni kopya sayısı ve mRNA ekspresyon seviyesi analiz edilen 41 MM hastasından 12'sinin parafin blok haline getirilmiş kemik iliği örneğinde DEK ve CD138 proteinlerinin ekspresyonu immunohistokimyasal yöntemle incelendi. Gerek bu 12 hastanın gerekse ilave olarak analiz ettiğimiz 15 MM, 13 MGUS hastası ve 9 sağlıklı kemik iliğine ait parafin-blok dokularının (örneklerin tamamı Vanderbilt Üniversitesi'nden sağlandı) incelenmesi sonucunda, kemik iliğinde yoğunlukla bulunan miyeloid ve eritroid seri hücrelerinin DEK antikoruyla boyandığı, ancak CD138 antikoruyla pozitif boyanan kontrol kemik iliği kesitlerindeki normal plazma hücreleri (Şekil 9.11), MM (Şekil 9.12) ve MGUS (Şekil 9.13) kesitlerindeki neoplastik plazma hücrelerinin DEK antikoruyla boyanmadığı görüldü. *DEK* geni kopya sayısında artış görülen 4 MM vakasının kesitlerinde de (MM no: 12, 13, 18 ve 25) benzer şekilde CD138 antikoruyla boyanan hücrelerde DEK antikoruyla boyanma olmadığı gözlemlendi (Şekil 9.14).

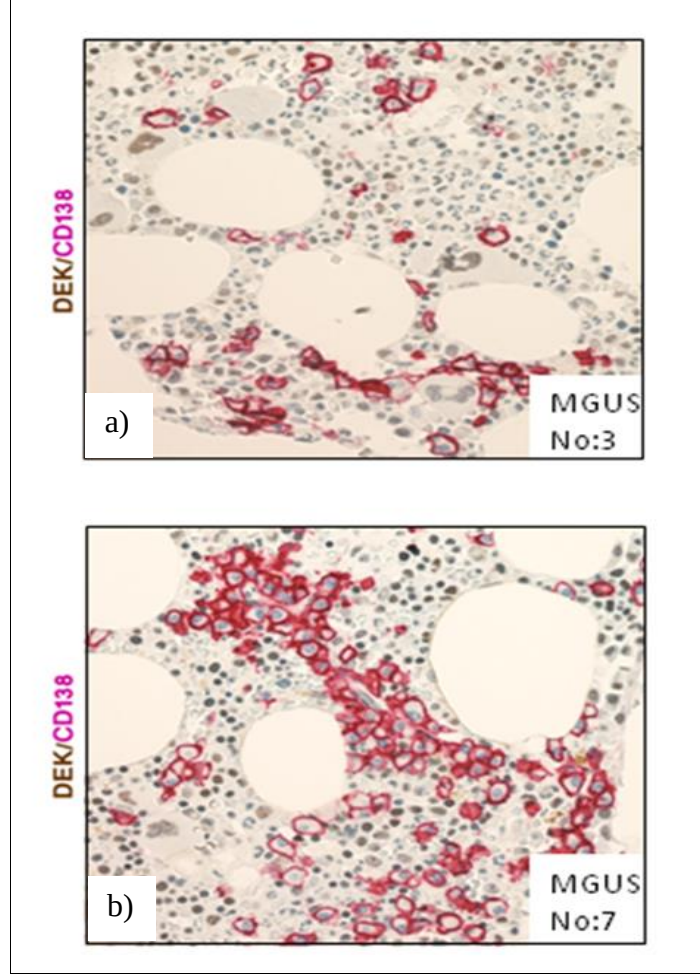
MM dışında, B-hücre kökenli diğer tümörlerde DEK ekspresyonunu tespit etmek amacıyla MZL (n=7), Burkitt lenfoma (BL; n=3) ve DLBCL (n=12) hastalarının (hasta örneklerin tamamı Vanderbilt Üniversitesinden sağlandı) parafin blok kesitleri de DEK ve CD138 antikorlarıyla İHK yöntemi kullanılarak boyandı. İHK analizleri sonucunda, MZL (Şekil 9.15), BL (Şekil 9.16) ve DLBCL (Şekil 9.17) kesitlerinde DEK'in tümör hücrelerinde orta-çok yoğunlukta eksprese olduğu ancak bu kesitlerde bulunan CD138^{pozitif} plazma hücrelerinde İHK yöntemiyle tespit edilebilecek düzeyde DEK proteini olmadığı gözlemlendi.



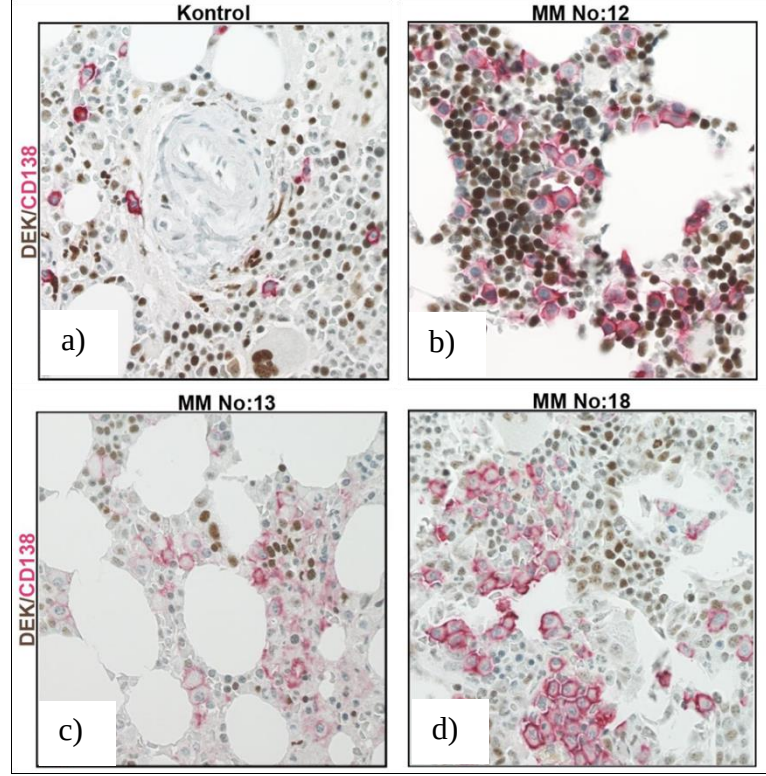
Şekil 9.11: Kontrol kemik iliği kesitlerinde DEK (çekirdekte kahverengi boyanma) ve CD138 antikorlarıyla (hücre yüzeyinde pembe boyanma) ikili İHK boyamasının mikroskopik fotoğrafları. a) Kontrol kemik iliği No:1, b) Kontrol kemik iliği No:2'ye ait kesitler. DEK antikoruyla boyanma göstermeyen hücrelerin çekirdekleri hematoxilenle mavi renk almaktadır. CD138^{pozitif} hücrelerde (pembe hücre zarı, mavi çekirdek) DEK antikoruyla boyanma gözlenmemektedir. Büyütme 400X'dir.



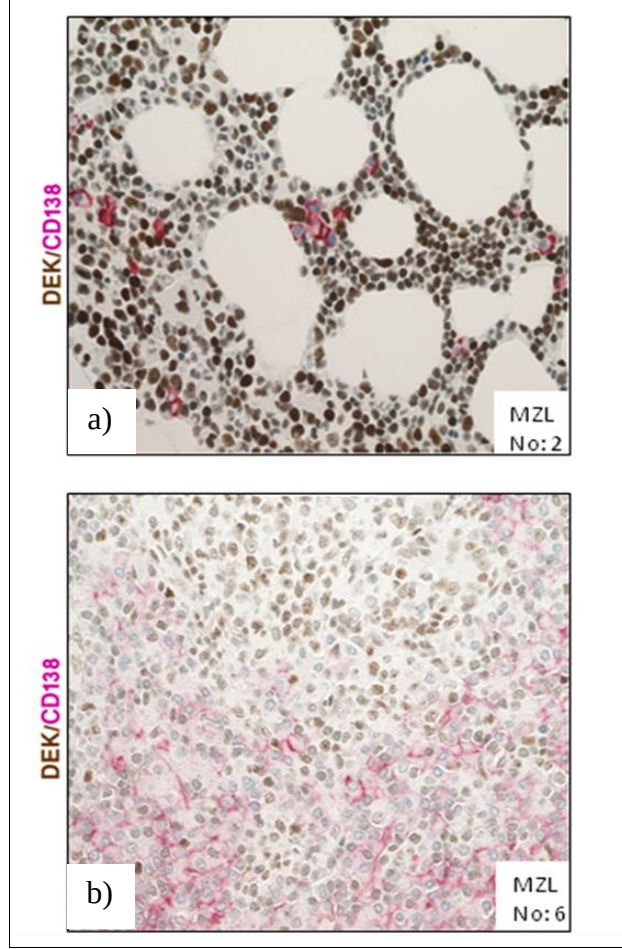
Şekil 9.12: MM kesitlerinde DEK (çekirdekte kahverengi boyanma) ve CD138 antikorlarıyla (hücre yüzeyinde pembe boyanma) ikili İHK boyamasının mikroskopik fotoğrafları. a) MM hasta No:44, b) MM hasta No:50'ye ait kesitler. DEK antikoruyla boyanmayan hücrelerin çekirdekleri hematoksisilenle mavi renk almaktadır. CD138^{pozitif} hücrelerde (pembe hücre zarı, mavi çekirdek) DEK antikoruyla boyanma gözlenmemektedir. Büyütme 400X'dir.



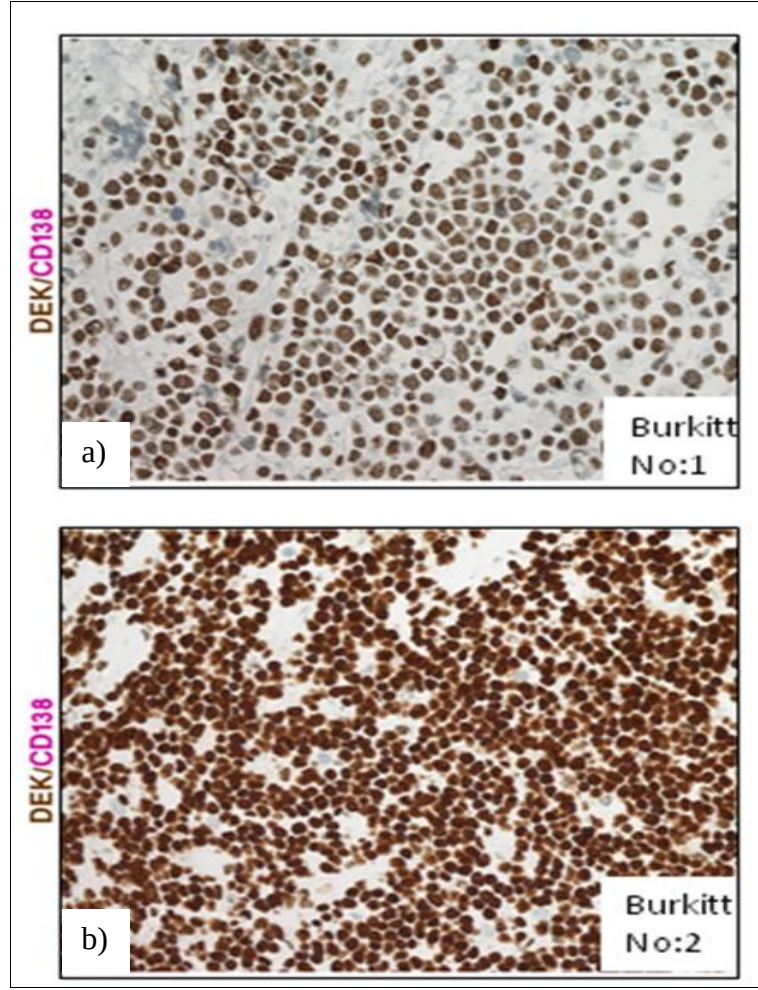
Şekil 9.13: MGUS kesitlerinde DEK (çekirdekte kahverengi boyanma) ve CD138 antikorlarıyla (hücre yüzeyinde pembe boyanma) ikili İHK boyamasının mikroskopik fotoğrafları. a) MGUS hasta No:3, b) MGUS hasta No:7'ye ait kesitler. CD138^{pozitif} hücrelerde (pembe hücre zarı, mavi çekirdek) DEK antikoruyla boyanma gözlenmemektedir. Büyütme 400X'dir.



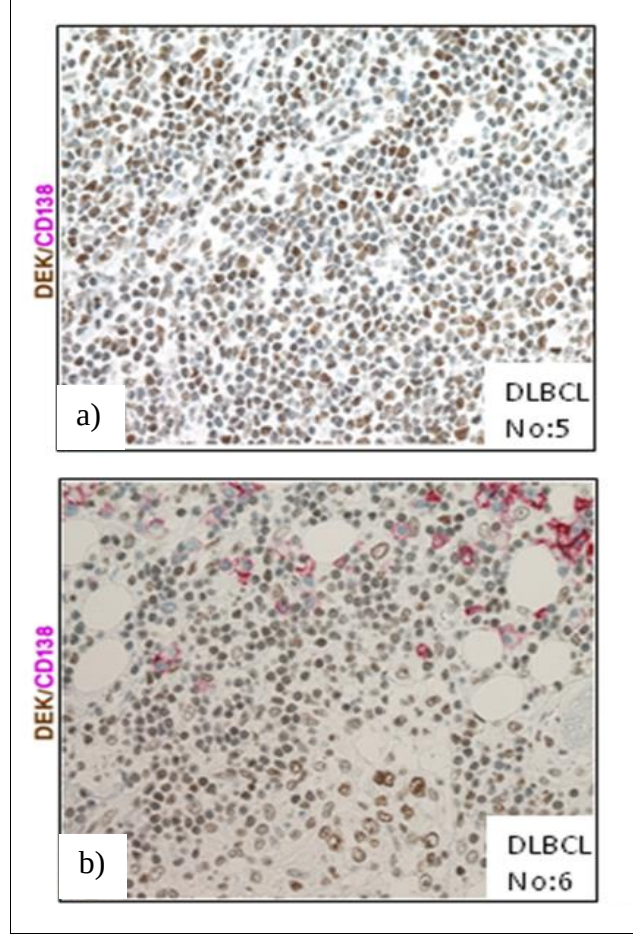
Şekil 9.14: Kontrol kemik iliği ve *DEK* geni kopya sayısı $CD138^{pozitif}$ hücrelerinde artmış olan 3 MM vakasının DEK ve CD138 antikorlarıyla ikili İHK boyamasının mikroskopik fotoğrafları. a) Kontrol kemik iliği örneği, b) MM hasta No:12, c) MM hasta No:13 ve d) MM hasta No:18'e ait kesitler (Tablo 9.3). DEK antikoruna için çekirdekte kahverengi boyanma gözlenirken, CD138 antikoruna için hücre yüzeyinde pembe boyanma gözlenmektedir. $CD138^{pozitif}$ hücrelerde (pembe hücre zarı, mavi çekirdek) DEK antikoruna boyanma gözlenmemektedir. Büyütme 400X'dir.



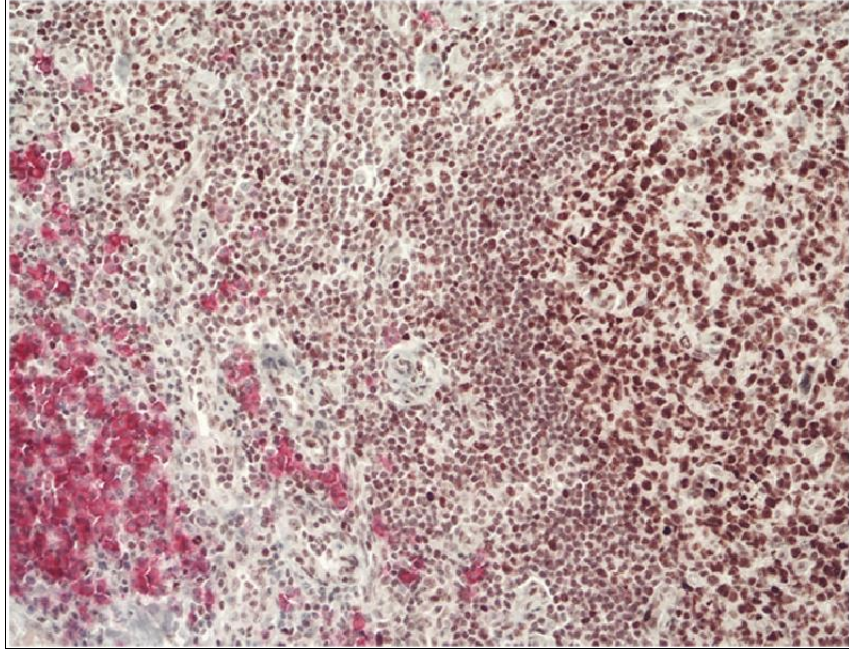
Şekil 9.15: Marjinal zone lenfoma kesitlerinde DEK (çekirdekte kahverengi boyanma) ve CD138 antikorlarıyla (hücre yüzeyinde pembe boyanma) ikili İHK boyamasının mikroskopik fotoğrafları. a) MZL hasta No:2, b) MZL hasta No:6'ya ait kesitler. CD138^{pozitif} hücrelerde (pembe hücre zarı, mavi çekirdek) DEK antikoruyla boyanma gözlenmemektedir. Büyütme 400X'dir.



Şekil 9.16: Burkitt lenfoma kesitlerinde DEK (çekirdekte kahverengi boyanma) ve CD138 antikorlarıyla (hücre yüzeyinde pembe boyanma) ikili İHK boyamasının mikroskopik fotoğrafları. a) BL hasta No:1, b) BL hasta No:2'ye ait kesitler. Her iki kesitte de CD138 ile boyanma gözlenmeyen lenfoma hücrelerinde DEK antikoruyla yoğun kahverengi boyanma gözlenmektedir. Büyütme 400X'dir.



Şekil 9.17: DLBCL kesitlerinde DEK (çekirdekte kahverengi boyanma) ve CD138 antikorlarıyla (hücre yüzeyinde pembe boyanma) ikili İHK boyamasının mikroskopik fotoğrafları. a) DLBCL hasta No:5, b) DLBCL hasta No:6'ya ait kesitler. CD138^{pozitif} hücrelerde (pembe hücre zarı, mavi çekirdek) DEK antikoruyla boyanma gözlenmemektedir. Büyütme 400X'dir.



Şekil 9.18: Lenf düğümü parafin kesitinin DEK (çekirdekte kahverengi boyanma) ve CD138 antikorlarıyla (hücre yüzeyinde pembe boyanma) ikili İHK boyamasının mikroskopik fotoğrafı. DEK antikoruyla boyanma göstermeyen hücrelerin çekirdekleri hematoxilenle mavi renk almaktadır. CD138^{pozitif} hücrelerde (pembe hücre zarı, mavi çekirdek) DEK antikoruyla boyanma gözlenmemektedir. Büyütme 200X'tir.

10. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

MM anormal şekilde klonal olarak çoğalmış plazma hücrelerinin kemik iliği ve diğer organları istilası ile karakterize olan bir kanser türüdür [Hideshima et al., 2004]. MM'ye sebep olan habis plazma hücreleri, anormal şekilde klonal olarak çoğalan B-lenfositleri tarafından oluşturulmaktadır. MM hücrelerinin öncelikli olarak yerleşim gösterdikleri kemik iliğinde varlıklarını sürdürebilmeleri stroma hücreleri (mezenkimal hücreler, osteoblastlar, makrofajlar vb.) ile olan iletişimlerine bağlıdır [Kim et al., 2012]. Hastalığa sebep olan etkenler bilinmemekle birlikte, hastalığın ileri yaş ile ilişkili olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Günümüzdeki tedavi uygulamaları ile 50-60 yaşın üzerindeki hastaların sağ kalım süreleri 2-3 yıl, 50 yaşın altında olan hastaların yaşam süreleri ise 5-6 yıl arasında değişmektedir. Mevcut olan tedavi yaklaşımlarının sağ kalım süresini uzatacak şekilde iyileştirilebilmesi, ya da ideal olarak hastalarda kalıcı iyileşme sağlanabilmesi için, hastalığın oluşumunda ve ilerleyişinde rol alan moleküler mekanizmaların gerek MM hücreleri gerekse stromal hücreler düzeyinde aydınlatılması ve stroma hücrelerinin de tedavilerde hedeflenmesi gerekmektedir [Dalton et al., 2004].

Pekçok hücre türünde eksprese olan *DEK* geni, MM'de kopya artışı görülen 6. kromozomda (6p22.3 bölgesinde) yer almaktadır ancak MM'de 6. kromozomda meydana gelen kopya sayısı artışının *DEK* genini ve *DEK* ekspresyon seviyesini etkileyip etkilemediğine dair bizim bilgimiz dahilinde bir literatür bilgisi bulunmamaktadır. Literatürdeki bu boşluğu doldurmak amacıyla, bu tez çalışmasında, MM hastalarının kemik iliği örneklerinde *DEK* geni kopya sayısının ve *DEK*'in ekspresyon seviyesinin belirlenmesini hedefledik.

Bu amaçla, öncelikle MM (n=30) ve sağlıklı kemik iliklerinin (n=8) parafin blok haline getirilmiş örneklerinden RNA izole edildi ve *DEK* mRNA ekspresyonu RT-qPCR yöntemiyle incelendi. RT-qPCR analizleri, 30 hastanın 12'sinde *DEK* ekspresyonu olmadığını gösterdi. (Tablo 9.1). Housekeeping genlerinin (*ACTB* ve *ABL*) ekspresyonunun gözlenmesine karşın, *DEK* ekspresyonunun bu 12 hasta örneğinde tespit edilememesinin olası sebepleri arasında, *ACTB* ve *ABL*'ye oranla çok daha düşük seviyede eksprese olan *DEK*'in, kemik iliği örneklerinin parafine gömülmesi sırasında uygulanan işlemler nedeniyle *DEK*-mRNA kalitesinin RT-qPCR ile tespit edilemeyecek kadar zarar görmüş olabileceği düşünüldü. RT-qPCR

sonuçlarının istatistiksel analizi, MM hastalarında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *DEK* geninin ekspresyonunun anlamlı oranda düştüğünü gösterdi (*DEK/ABL1* normalizasyonu $P=0.0014$; *DEK/ACTB* normalizasyonu $P=0.0116$) (Şekil 9.5). *DEK* ekspresyonu gözlenmeyen 12 hastanın tamamının “III. Evre” klinik tanısı almış olması (Tablo 9.2) *DEK* ekspresyon seviyesi ile hastalığın klinik evresi arasında ilişki olabileceğini düşündürse de, I. ve II. Evrede olan yeterli sayıda hasta örneğinin olmaması ve “III. Evre” A ve B seviyelerine ait hasta örneklerindeki *DEK* ekspresyonları arasında belirgin bir fark bulunmamış olması nedeni ile kesin bir yargıya varılamadı.

RT-qPCR yöntemiyle analiz ettiğimiz MM ve sağlıklı kemik iliklerinin parafine gömülmüş dokularından alınan kesitler, laboratuvarımızda yüksek lisans eğitimini tamamlayan Ahmet Özdilek’in GYTE-BAP destekli tez projesi kapsamında İHK yöntemiyle de incelendi ve hücre yüzeyinde yerleşim gösteren plazma hücre belirteci olan CD138 proteini ve hücre çekirdeğinde yerleşim gösteren *DEK* proteininin ekspresyon seviyesi belirlendi. İHK inceleme sonuçları, *DEK*’in sağlıklı ve MM hastalarının kemik iliğindeki miyeloid ve eritroid seri hücrelerinde hücre çekirdeğinde eksprese edildiğini gösterdi. Ancak, MM hastalarının CD138^{pozitif} neoplastik plazma hücrelerinde ya da normal kemik iliğinde bulunan CD138^{pozitif} plazma hücrelerinde İHK yöntemiyle tespit edilebilecek düzeyde *DEK* proteininin eksprese olmadığını gösterdi.

Elde ettiğimiz RT-qPCR sonuçları ve İHK verileri birlikte değerlendirildiğinde, RT-qPCR analizinde kullandığımız RNA örneklerinin total kemik iliği parafin blok kesitlerinden elde edilmiş olması nedeniyle, kemik iliğinde bulunan yüksek *DEK* ekspresyonuna sahip hücrelerin oranının (CD138^{negatif} olan ve ağırlıklı olarak miyeloid ve eritroid seri hücreleri), CD138^{pozitif} MM hücrelerindeki muhtemelen azalmış ya da tamamen baskılanmış *DEK* ekspresyonunun RT-qPCR’la tespitini maskeleyebileceği sonucuna varıldı. Aynı sebeple, CD138^{pozitif} olan tümör hücrelerindeki *DEK* geninin kopya sayısının da parafin bloklardan elde edilen DNA örneklerinde güvenilir şekilde tespitinin mümkün olmayacağına karar verildi.

Bu sebeple, bu tez çalışmamızın hedefi olan MM hücrelerinde *DEK* geni ekspresyonu ve *DEK* kopya sayısı analizlerinin güvenilir şekilde yorumlanabilmesi için bu deneylerde CD138^{negatif} olan kemik iliği hücrelerinden ayrıştırılmış olan CD138^{pozitif} MM hücrelerinin kullanılmasının gerekli olduğuna karar verildi.

Taze veya dondurulmuş kemik iliği hücrelerinin RT-qPCR sonuçları, kontrol kemik iliği ile ve aynı hastaların CD138^{negatif} (kanserli olmayan) hücreleriyle karşılaştırıldığında, CD138^{pozitif} MM hücrelerinde *DEK* mRNA ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldığını gösterdi (Şekil 9.8).

qPCR (*DEK*-kopya sayısı) analizleri, incelediğimiz 41 hastadan 4'ünün (%9,76) CD138^{pozitif} MM hücrelerinde *DEK* geninin kopya sayısında artış olduğunu, bu hastaların CD138^{negatif} olan kemik iliği hücrelerindeyse *DEK* kopya sayısının normal olduğunu gösterdi (Şekil 9.9). Literatürde daha önce MM hastalarının % 22,8'inde (114 MM hastasının 26'sında), kromozom 6p22.3 bölgesinde kopya sayısı artışı olduğu tespit edilmiştir [Walker et al., 2010]. Bu tez çalışmasında elde ettiğimiz sonuçlar, literatürde belirlenmiş olan 6p22.3 bölgesindeki kopya sayısı artışının muhtemelen *DEK* genini de içerdiğini ancak bizim analiz ettiğimiz hasta sayısının düşük olması sebebiyle literatürdeki %22 oranına erişilememiş olduğunu düşündürmektedir. Özetle, ilk kez bizim çalışmamızda, *DEK* geni kopya sayısının MM hastalarının yaklaşık %10'unda artış gösterdiği ve bu artışın MM hastalarının CD138^{pozitif} hücrelerine özgü olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, MM hastalarının CD138^{pozitif} hücrelerinde meydana gelen kromozomal anomalileri sonucu sağlıklı plazma hücrelerinin gelişiminde aksaklıklar meydana geldiği ve MM'un neoplastik transformasyona uğramış olan plazma hücrelerinden kaynaklandığı hipotezini desteklemektedir. *DEK*'in transkripsiyonunda rol alan E2F'in normal ve habis plazma hücre gelişimi sırasında BLIMP-1 tarafından baskılanmış olması, *DEK*'in endojen promotor kontrolünde olmaksızın ve ekspresyonu düzenleyici bölgeleri içermeyecek şekilde gen bölgesinin kopya sayısının artmış olması, *DEK* promotor bölgesinin metilasyona uğraması ve post-transkripsiyonel ve post-translasyonel düzenlemelerin, MM hastalarının CD138^{pozitif} hücrelerindeki *DEK* kopya sayısı artışının *DEK* ekspresyonuna yansımamasının olası sebepleri arasında bulunabileceği düşünülmektedir.

Normal lenf düğümü parafin kesitlerinde yaptığımız İHK analizleri, lenf dokusunda yer alan B hücrelerinde *DEK* ile daha hafif boyanma gözlenirken, germinal merkezde bulunan ve çoğalmakta olan sentroblastların (çoğalma ve farklılaşma aşamalarının ardından plazma hücrelerine dönüşen öncü hücreler) daha yoğun olarak *DEK* proteini eksprese ettiği tespit edildi (Şekil 9.18). *DEK*'in İHK ile tespit edilebilir düzeyde eksprese edildiği B hücrelerinden köken alan lenfoma türlerindeyse, köken aldıkları normal hücrelere benzer düzeyde *DEK*

ekspresyonunun bulunduğu gözlendi (MZL (Şekil 9.15), BL(Şekil 9.16) ve DLBCL (Şekil 9.17)). Ancak bu tümörlerin analizinde kantitatif yöntemler kullanmadığımızdan, incelenen lenfoma dokularında *DEK* ekspresyonunun normal hücrelere oranla artıp artmadığının net cevabını henüz bilmemekteyiz.

Özetle, TÜBİTAK 1001 projesi (SBAG 212T108) kapsamında yürüttüğümüz bu yüksek lisans tez çalışmasında elde ettiğimiz sonuçlar, MM de dahil olmak üzere B-hücreli tümörlerde *DEK* ekspresyon seviyesinin tümörün köken aldığı hücreleri yansıttığını ve *DEK*'in negatif bir immunohistokimyasal belirteç olarak kullanılmasının MM'nin patolojik tanısını kolaylaştırıcı ilave bir faktör olabileceğini göstermektedir. Elde ettiğimiz veriler literatüre ilk kez kazandırılmış olup, European Hematology Association (EHA) tarafından 12-15 Haziran, 2014 tarihinde İtalya, Milano'da yapılan kongrede (19th Congress of EHA) poster özeti olarak yayımlanmıştır (Haematologica, 2014; 99[s1] | 635).

KAYNAKLAR

Adams A. K., Hallenbeck G. E., Casper K. A., Patil Y. J., Wilson K. M., Kimple R. J., Lambert P. F., Witte D. P., Xiao W., Gillison M. L., Wikenheiser-Brokamp K. A., Wise-Draper T. M., Wells S. I., (2014), "DEK promotes HPV-positive and -negative head and neck cancer cell proliferation", *Oncogene*, 9, 625-641.

Avet-Loiseau H., Attal M., Moreau P., Charbonnel C., Garban F., Hulin C., Leyvraz S., Michallet M., Yakoub-Agha I., Garderet L., Marit G., Michaux L., Voillat L., Renaud M., Grosbois B., Guillermin G., Benboubker L., Monconduit M., Thieblemont C., Casassus P., Caillot D., Stoppa A. M., Sotto J. J., Wetterwald M., Dumontet C., Fuzibet J. G., Azais I., Dorvaux V., Zandecki M., Bataille R., Minvielle S., Harousseau J. L., Facon T., Mathiot C., (2007), "Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome", *Blood*, 109, 3489-3495.

Beillard E., Pallisgaard N., van der Velden V. H., Bi W., Dee R., van der Schoot E., Delabesse E., Macintyre E., Gottardi E., Saglio G., Watzinger F., Lion T., van Dongen J. J., Hokland P., Gabert J., (2003), "Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program", *Leukemia*, 17, 2474-2486.

Bergsagel P. L., Chesi M., Nardini E., Brents L. A., Kirby S. L., Kuehl W. M., (1996), "Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 13931-13936.

Bryder D., Rossi D. J., Weissman I. L., (2006), "Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell", *American Journal of Pathology*, 169, 338-346.

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, 1202-1207.

Chesi M., Bergsagel P. L., (2013), "Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates" *International Journal of Hematology*, 97, 313-323.

Chesi M., Brents L. A., Ely S. A., Bais C., Robbani D. F., Mesri E. A., Kuehl W. M., Bergsagel P. L., (2001), "Activated fibroblast growth factor receptor 3 is an oncogene that contributes to tumor progression in multiple myeloma", *Blood*, 97, 729-736.

Dalton W. S., Hazlehurst L., Shain K., Landowski T., Alsina M., (2004), "Targeting the bone marrow microenvironment in hematologic malignancies", *Seminars in Hematology*, 41, 1-5.

Durie B. G., Salmon S. E., (1975), "A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival", *Cancer*, 36, 842-854.

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, 49-58.

Fonseca R., Bergsagel P. L., Drach J., Shaughnessy J., Gutierrez N., Stewart A. K., Morgan G., Van Ness B., Chesi M., Minvielle S., Neri A., Barlogie B., Kuehl W. M., Liebisch P., Davies F., Chen-Kiang S., Durie B. G., Carrasco R., Sezer O., Reiman T., Pilarski L., Avet-Loiseau H., (2009), "International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review", *Leukemia*, 23, 2210-2221.

Galson D. L., Silbermann R., Roodman G. D., (2012), "Mechanisms of multiple myeloma bone disease", *Bonekey Reports*, 1, 135.

Grandien A., Fucs R., Nobrega A., Andersson J., Coutinho A., (1994), "Negative selection of multireactive B cell clones in normal adult mice", *European Journal of Immunology*, 24, 1345-1352.

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, 3412-3420.

Herzog S., Reth M., Jumaa H., (2009), "Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling", *Nature Reviews Immunology*, 9, 195-205.

Hideshima T., Bergsagel P. L., Kuehl W. M., Anderson K. C., (2004), "Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications", *Blood*, 104, 607-618.

Hideshima T., Mitsiades C., Tonon G., Richardson P. G., Anderson K. C., (2007), "Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets", *Nature Reviews Cancer*, 7, 585-598.

Hu H. G., Illges H., Gruss C., Knippers R., (2005), "Distribution of the chromatin protein DEK distinguishes active and inactive CD21/CR2 gene in pre- and mature B lymphocytes", *International Immunology*, 17, 789-796.

Iwasaki H., Akashi K., (2007), "Hematopoietic developmental pathways: on cellular basis", *Oncogene*, 26, 6687-6696.

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, 26317-26323.

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

Kim J., Denu R. A., Dollar B. A., Escalante L. E., Kuether J. P., Callander N. S., Asimakopoulos F., Hematti P., (2012), "Macrophages and mesenchymal stromal cells support survival and proliferation of multiple myeloma cells", *British Journal of Haematology*, 158, 336-346.

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

Korbet S. M., Schwartz M. M., (2006), "Multiple myeloma", *Journal of the American Society of Nephrology*, 17, 2533-2545.

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

Kuehl W. M., Bergsagel P. L., (2012), "Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor", *Journal of Clinical Investigation*, 122, 3456-3463.

Kyle R. A., Gertz M. A., Witzig T. E., Lust J. A., Lacy M. Q., Dispenzieri A., Fonseca R., Rajkumar S. V., Offord J. R., Larson D. R., Plevak M. E., Therneau T. M., Greipp P. R., (2003), "Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma", *Mayo Clinic Proceedings*, 78, 21-33.

Lee A. H., Iwakoshi N. N., Glimcher L. H., (2003), "XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response" *Molecular and Cellular Biology*, 23, 7448-7459.

Ling S. C., Lau E. K., Al-Shabeeb A., Nikolic A., Catalano A., Iland H., Horvath N., Ho P. J., Harrison S., Fleming S., Joshua D. E., Allen J. D., (2012), "Response of myeloma to the proteasome inhibitor bortezomib is correlated with the unfolded protein response regulator XBP-1", *Haematologica*, 97, 64-72.

Mahindra A., Hideshima T., Anderson K. C., (2010), "Multiple myeloma: biology of the disease", *Blood Reviews*, 24, S5-11.

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, 9484-9496.

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

Pichiorri F., Suh S. S., Rocci A., De Luca L., Taccioli C., Santhanam R., Zhou W., Benson D. M. Jr., Hofmainster C., Alder H., Garofalo M., Di Leva G., Volinia S., Lin H. J., Perrotti D., Kuehl M., Aqeilan R. I., Palumbo A., Croce C. M., (2010), "Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 impairs the

p53/MDM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development", *Cancer Cell*, 18, 367-381.

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

Rajkumar S. V., (2011), "Treatment of multiple myeloma", *Nature Reviews Clinical Oncology*, 8, 479-491.

Schlissel M. S., (2003), "Regulating antigen-receptor gene assembly", *Nature Reviews Immunology*, 3, 890-899.

Schmidlin H., Diehl S. A., Blom B., (2009), "New insights into the regulation of human B-cell differentiation", *Trends in Immunology*, 30, 277-285.

Seagal J., Melamed D., (2003), "Selection events in directing B cell development", *Histology and Histopathology*, 18, 519-527.

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

Shaffer A. L., Lin K. I., Kuo T. C., Yu X., Hurt E. M., Rosenwald A., Giltane 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, 51-62.

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

Singhal S., Mehta J., (2006), "Multiple myeloma", *Clinical Journal of American Society of Nephrology*, 1, 1322-1330.

Sirohi B., Powles R., (2004), "Multiple myeloma", *Lancet*, 363, 875-887.

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

Tokoyoda K., Egawa T., Sugiyama T., Choi B. I., Nagasawa T., (2004), "Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development", *Immunity*, 20, 707-718.

Turner C.A. Jr., Mack D. H., Davis M. M., (1994), "Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells", *Cell*, 77, 297-306.

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, 1687-1697.

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, 1-9.

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, e56-65.

Weissman I. L., (2000), "Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution", *Cell*, 100, 157-168.

Yang B., Yu R. L., Chi X. H., Lu X. C., (2013), "Lenalidomide treatment for multiple myeloma: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials", *PLoS One*, 8, e64354, 1-9.

Yarkoni Y., Getahun A., Cambier J. C., (2010), "Molecular underpinning of B-cell anergy", *Immunological Reviews*, 237, 249-263.

Web 1, (2014), http://www.pathpedia.com/education/eatlas/histology/lymph_node/images, (Eriřim Tarihi: 01.07.2014).

Web 2, (2014), <http://www.stemcell.com/en/Products/All-Products/EasySep-Human-CD138-Positive-Selection-Kit>, (Eriřim Tarihi: 03.05.2014).

ÖZGEÇMİŞ

Türkan Çakar 01.09.1989 tarihinde Muş, Varto’da doğdu. Lisans eğitimini 2006-2011 yılları arasında İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nde tamamladı. 2012 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü (GYTE), Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda yüksek lisansa başladı. 2012 itibariyle aynı bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmaya başlayan Türkan Çakar’ın yüksek lisans eğitimi yine aynı bölümde devam etmektedir.

EKLER

Ek A: Telif Hakkı Bulunan Materyaller İçin Alınan İzinler

Şekil No	Lisans Tarihi	Lisans No	Telif Sahibi
2.1	11.08.2014	3445900500905	Elsevier
3.2	07.09.2014	3463440741998	Nature Publishing Group
4.2	11.08.2014	3445900774675	Nature Publishing Group