

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN STROMA VE MONOSİT HÜCRE HATLARINDA
DEK1 VE DEK2 İZOFORMLARININ SALGILANMASININ
BELİRLENMESİ

BÜŞRA ÇELİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2021

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN STROMA VE MONOSİT HÜCRE
HATLARINDA DEK1 VE DEK2 İZOFORMLARININ
SALGILANMASININ BELİRLENMESİ

BÜŞRA ÇELİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. AYTEN KANDİLCİ

GEBZE
2021

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

**DETERMINATION OF THE SECRETION OF
DEK1 AND DEK2 ISOFORMS IN HUMAN
STROMA AND MONOCYTE CELL LINES**

BÜŞRA ÇELİK
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETIC

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. AYTEN KANDİLCİ

GEBZE
2021



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 08/07/2021 tarih ve 2021/32 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 26/07/2021 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Büşra ÇELİK'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Ayten KANDİLCİ

ÜYE

: Doç. Dr. Naci ÇİNE

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Fatma İnci ÖZDEMİR

ONAY

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

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Hematopoez, hematopoietik kök hücrelerin miyeloid, lenfoid ve eritroid soylara farklılaştığı ve olgunlaştığı, kemik iliği nişlerinde gerçekleşen fizyolojik bir süreçtir. Kan hücrelerinin olgunlaşması, immün yanıtın oluşumu ve düzenlenmesi, kemik iliği mikroçevresindeki hücrelerden salgılanan sitokinler ve bu hücreler arasındaki etkileşimlerle sağlanır. DEK, uzun süreli hematopoetik kök hücrelerin devamlılığını sağlama ve bu hücrelerin kendini yenileme fonksiyonları için gereklidir. DEK ekspresyon seviyesi hematopoetik ve epitel kökenli çoğalan hücrelerde, farklılaşan-olgunlaşan hücrelere göre daha yüksektir. Aktive olan makrofajlardan salgılandığı bilinen DEK'in kemoatraktan rolü kanser, inflamasyon ve otoimmün hastalıklarda potansiyel bir terapötik hedef olabileceğini düşündürmektedir. DEK'in bilinen iki izoformu mevcuttur (DEK1 ve DEK2) ve özetlenen fonksiyonların tamamı literatürde DEK olarak bilinen DEK1 için araştırılmıştır. Çünkü genel olarak tüm hücrelerde DEK1'in ekspresyon seviyesi DEK2'ye göre daha yüksektir. İlave olarak, mevcut ticari antikolarla Western blot yöntemiyle ancak DEK1 izoformu tespit edilebilmektedir. Bu tez çalışmasında, DEK1 ve DEK2'nin Hs27A insan kemik iliği stroma hücre hattında ve U937 pro-monosit hücre hattında hücre proliferasyonuna etkisi ve bu hücrelerden salgılanıp salgılanmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, Myc epitopu ile füzyon haldeki DEK1 ve DEK2 genleri MSCV-IRES-GFP retroviral ekspresyon vektörüne klonlandı ve retroviral transdüksiyonla kalıcı olarak MycDEK1 veya MycDEK2 eksprese eden U937 ve Hs27A hücreleri elde edildi. Bu hücrelerde aşırı DEK1 veya DEK2 ifadesinin hücre çoğalmasını etkilemediği gözlemlendi. Ayrıca, farklı konsantrasyonlarda toplanan hücre medyumunun Western blot ve ELISA analizi, DEK izoformlarının U937 veya Hs27A hücrelerinde saptanabilir seviyelerde salgılanmadığını gösterdi. Bu durumun IL-8 veya PMA gibi uyaranlar varlığında da değişmediği tespit edildi. Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 118Z765 no'lu 1001 projesi ile desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: DEK İzofomları, DEK salgılanması, Hs27A, U937.

SUMMARY

Hematopoiesis is a physiological process that takes place in bone marrow niches where hematopoietic stem cells differentiate and mature into myeloid, lymphoid and erythroid lineages. Maturation of the blood cells, formation and regulation of the immune response are mediated by cytokines secreted from cells in the bone marrow microenvironment and the interactions between these cells. DEK is necessary for the maintenance and self-renewal of long-term hematopoietic stem cells. DEK expression level is higher in proliferating hematopoietic and epithelial cells when compared to the differentiated-matured cells. The chemoattractant role of DEK secreted from activated macrophages suggests that it may be a potential therapeutic target in cancer, inflammation and autoimmune diseases. There are two known isoforms of DEK (DEK1 and DEK2) and all of the functions outlined have been investigated for DEK1 that is known as DEK in the literature. Because the expression level of DEK1 is higher than DEK2 in general. In addition, only DEK1 isoform can be detected by Western blot method with available commercial antibodies. In this thesis, we aimed to determine whether DEK1 and DEK2 are secreted from the Hs27A human bone marrow stroma cell line and U937 pro-monocyte cell line as well as if they effect the proliferation. For this purpose, Myc epitope tagged DEK1 and DEK2 genes were cloned into the MSCV-IRES-GFP retroviral expression vector and U937 and Hs27A cells permanently expressing MycDEK1 or MycDEK2 were obtained by retroviral transduction. Using these cell lines, we found that DEK1 or DEK2 overexpression did not affect proliferation. In addition, Western blot and ELISA analysis of the conditioned medium obtained from these cells showed that under the experimental conditions that we used both DEK isoforms were not secreted from the U937 or Hs27A cells at the detectable levels, in presence or absence of PMA or IL-8. This thesis study was supported by TUBITAK 1001 project (grant number 118Z765).

Key Words: DEK Isoforms, Secretion of DEK, Hs27A, U937.

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bilgisini, anlayışını, sabrını, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Ayten KANDİLCİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yardım istemekten hiçbir zaman çekinmediğim ve bana destek olan değerli hocam Emrah Özçelik'e ve laboratuvar arkadaşlarım Açelya Avcı ve Ahmet Kalaycı'ya; gerektiğinde emeğini ve desteğini esirgemeyen Metin Çetin hocama en içten sevgi ve teşekkürlerimi sunmaktan mutluluk duyarım.

Lisans eğitimim boyunca yanımda olan ve sonrasında desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen biricik arkadaşlarım Azime Akçaöz ve Başak Çoban'a, ihtiyacım olduğu anda yanımda olan sevgili arkadaşlarım Seda Kirazlı ve Hilal Civelek'e teşekkür ederim.

Tüm bunların yanında tanıştığımız ilk andan beri kocaman yüreği ve sevgisi ile bana verdiği manevi destek, göstermiş olduğu sabır ve anlayıştan dolayı değerli eşim Yusuf Alper ÇELİK ile bugünlere gelmemi sağlayan, sevgi ve desteklerini esirgemeyen ailemize sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
2.1. Hematopoez	2
2.2. Kemik İliği Mikroçevresi ve Hematopoezdeki Önemi	3
2.2.1. Monosit/Makrofaj Hücrelerinin Yapı ve Fonksiyonları	7
2.2.2. Monosit Farklılaşma Yolağı	9
2.3. Sekretom	10
2.3.1. Veziküller, Kemokinler ve İntegrinler	12
2.4. DEK Geni	14
2.4.1. DEK İzofomları	15
2.4.2. DEK'in Fonksiyonları	17
2.4.3. Hücre Dışına Salgılanan DEK	17
3. MATERYAL	20
4. METOT	25
4.1. Hücre Kültürü	25
4.2. Mikoplazma Kontrolü	25
4.3. Hücrelerin DEK1 ve DEK2 Aşırı İfadesi için Retrovirüs Üretilmesi ve Transdüksiyon	26
4.3.1. Transfeksiyon	26
4.3.2. Transdüksiyon	27
4.4. Transdükte Olmuş Hücrelerin Akış Sitometrisi ile Ayrıştırılması	28

4.5. Western Blot	29
4.5.1. Protein İzolasyonu	29
4.5.2. Protein Miktarının Belirlenmesi	29
4.5.3. SDS Jel Elektroforezi	30
4.5.4. Proteinlerin Jelden Membrana Transferi	30
4.5.5. Antikor Uygulaması	30
4.5.6. Görüntüleme	31
4.6. Proliferasyon Analizi	32
4.7. U937 Hücrelerinin Makrofaja Farklılaştırılması	32
4.8. Hücre Medyumunda Protein Ekspresyonunun Araştırılması	33
4.8.1. Hücre Medyumunun Toplanması	33
4.8.2. Medyumda DEK1 ve DEK2 Varlığının Western Blot Yöntemiyle Analizi	34
4.8.3. ELISA Yöntemi	35
4.9. İmmünfloresan Boyama ve Konfokal Hücre Görüntülemesi	36
4.10. İstatistiksel Analiz	37
5. BULGULAR	38
5.1. MycDEK1 veya MycDEK2‘yi Kalıcı Olarak Aşırı İfade Eden U937 ve Hs27A Hücrelerinin Oluşturulması	38
5.2. MycDEK1 veya MycDEK2 ifadesi arttırılmış U937 ve Hs27A Hücrelerinde Proliferasyon Analizleri	41
5.3. Hs27A Hücre Hattında MycDEK1 ve MycDEK2 Proteinlerinin Hücrelerden Salgılanıp Salgılanmadığının Western Blot Yöntemiyle Analiz Edilmesi	42
5.4. U937 Hücre Hattında MycDEK1 ve MycDEK2 Proteinlerinin Hücrelerden Salgılanıp Salgılanmadığının Western Blot Yöntemiyle Analiz Edilmesi	44
5.5. DEK İzoformlarının Salgısının ELISA Yöntemiyle Araştırılması	47
5.6. Modifiye Edilmiş U937 Hücrelerinin PMA ile Farklılaştırılması ve DEK İzoformları Lokalizasyonunun Araştırılması	49
6. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	51
KAYNAKLAR	55

ÖZGEÇMİŞ

67

EKLER

68

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kisaltmalar

Açıklamalar

AML	: Akut Miyeloid Lösemi
BSA	: Bovine Serum Albumin
CCL	: C-C motif Chemokine Ligand
CCR	: C-C motif Chemokine Receptor
CD	: Cluster of Differentiation
CD146	: Melanoma Cell Adhesion Molecule (MCAM)
CK2	: Casein Kinase 2
CLP	: Common Lymphoid Progenitor
CM	: Conditioned Medium
cMoP	: Common Monocyte Progenitors
CMP	: Common Myeloid Progenitor
CO ₂	: Karbondioksit
CXCL	: C-X-C motif Chemokine Ligand
CXCR	: C-X-C motif Chemokine Receptor
DEK1	: DEK izoform 1
DEK2	: DEK izoform 2
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ECM	: Extracellular Matrix
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic Acid
ER	: Endoplazmik Retikulum
FACS	: Fluorescence-Activated Cell Sorting
FBS	: Fetal Bovine Serum
G-CSF	: Granulocyte colony-stimulating factor

GFP	: Green Flourescent Protein
GM-CSF	: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GMÖ	: Granüosit/Makrofaj Öncül Hücre
H ₂ O	: Su
HKH	: Hematopoietik Kök Hücre
HSPG	: Heparan Sulfate Proteoglycans
ICAM	: Intercellular Adhesion Molecule
IL-6	: İnterlökin-6
IL-8	: İnterlökin-8
JIA	: Juvenile Idiopathic Arthritis
kDa	: Kilodalton
LPS	: Lipopolisakkarit
MCP-1	: Monosit Kemoatraktan Protein-1
M-CSF	: Macrophage colony-stimulating factor
MD1	: MycDEK izoform 1
MD2	: MycDEK izoform 2
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
MDÖ	: Monosit/Dentritik Öncül Hücre
MÖH	: Multipotent Öncü Hücre
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
Myc	: Myc epitope tag
NETs	: Neutrophil Extracellular Traps
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PDGF	: Platelet-Derived Growth Factor
PMA/TPA	: Phorbol myristate acetate/ Tetradecanoylphorbol acetate
SAF/SAP	: Scaffold Attachment Factor
SDF-1	: Stromal Cell-Derived Factor 1

TBS	: Tris Buffered Saline
TGF- β	: Transforming Growth Factor Beta
TNF α	: Tumor Necrosis Factor Alpha
UPS	: Unconventional Protein Secretion
VCAM	: Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	: Vascular Endotelial Growth Factor
VLA	: Very Late Antigen

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Hematopoezin şematik gösterimi.	3
2.2: Protein Salgılama Yolakları.	11
2.3: DEK'in DNA bağlanmasında yer alan fonksiyonel bölgeleri ve post translasyonel modifikasyonlarının şematik yapısı.	16
2.4: DEK izoformlarının şematik yapısı.	16
2.5: Hücre dışı DEK'in Hematopoez ve İnflamasyonda Olası Roller.	19
3.1: MIG Retroviral Vektörün Haritası.	24
5.1: Retroviral transdüksiyon ardından FACS ile ayrıştırılan U937 hücre hattında aşırı DEK1/DEK2 ifadesinin Accuri C6 Flow Sitometri Analizi.	38
5.2: FACS ile ayrıştırılan U937 hücre hatlarının inverted mikroskop görüntüleri.	39
5.3: FACS ile ayrıştırılan U937 hücre hattında aşırı DEK ifadesinin BD-DEK antikoru ve Myc antikoru kullanılarak yapılan Western blot analizi.	40
5.4: Aşırı DEK ifadesinin Hs27A ve U937 hücre hatlarında Western blot yöntemiyle Bethyl DEK antikoru kullanılarak incelenmesi.	40
5.5: Hs27A hücre hattında aşırı DEK1/DEK2 ifadesinin Accuri C6 Flow Sitometri Analizi.	41
5.6: Hs27A hücre hattında aşırı MycDEK1 ve MycDEK2 ifadesinin Myc ve BD DEK antikoru kullanılarak Western blot analizinde doğrulanması.	41
5.7: Aşırı DEK ekspresyonunun Hs27A (A) ve U937 (B) hücrelerinin büyümeleri üzerindeki etkisi.	42
5.8: Hs27A hücre hattında medyum konsantrasyonu öncesi hücre canlılıklarının inverted mikroskop ile gösterilmesi.	43
5.9: Hs27A hücre hattı medyumunda DEK1 ve DEK2 izoform proteinlerinin Western blot analizi.	44

5.10:	U937 hücre hatlarının IL-8 varlığında CM konsantrasyonu öncesi inverted mikroskop ile alınmış görüntüleri.	45
5.11:	PMA ile farklılaştırılan U937 hücre hatlarının CM konsantrasyonu öncesi inverted mikroskopla alınmış görüntüleri.	46
5.12:	U937 hücre hatlarının lizat ve CM'sinde DEK1 ve DEK2 izoformlarının Western blot analizi.	47
5.13:	Hs27A hücre hattı total proteinleri (GFP, MD1, MD2) ve CM örneklerinin ELISA yöntemiyle incelenmesi.	48
5.14:	U937 hücre hattı total proteinleri (GFP, MD1, MD2) ve CM örneklerinin ELISA yöntemiyle incelenmesi.	48
5.15:	PMA uygulanan (100 ng/ml, 72 saat) ve kontrol parental U937 hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü.	49
5.16:	PMA uygulanan ve uygulanmayan U937 hücrelerinde MycDEK1 ve MycDEK2 izoformlarının IF boyama ve konfokal mikroskop analizi.	50

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.1: Cihazlar.	20
3.2: Sarf Malzemeler.	21
3.3: Kullanılan Kimyasallar ve Kitler.	22
3.4: Hücre Kültür Malzemeleri.	23
3.5: Hücre Hatları.	23
3.6: Primer ve Sekonder Antikorlar.	23
3.7: Plazmitler ve Vektörler.	24
3.8: Kullanılan Çözeltiler.	24
4.1: 293T hücrelerinin transfeksiyonunda kullanılan retroviral vektörler ve miktarları	27
4.2: Western Blot analizinde kullanılan antikor sulandırma oranları.	31

1. GİRİŞ

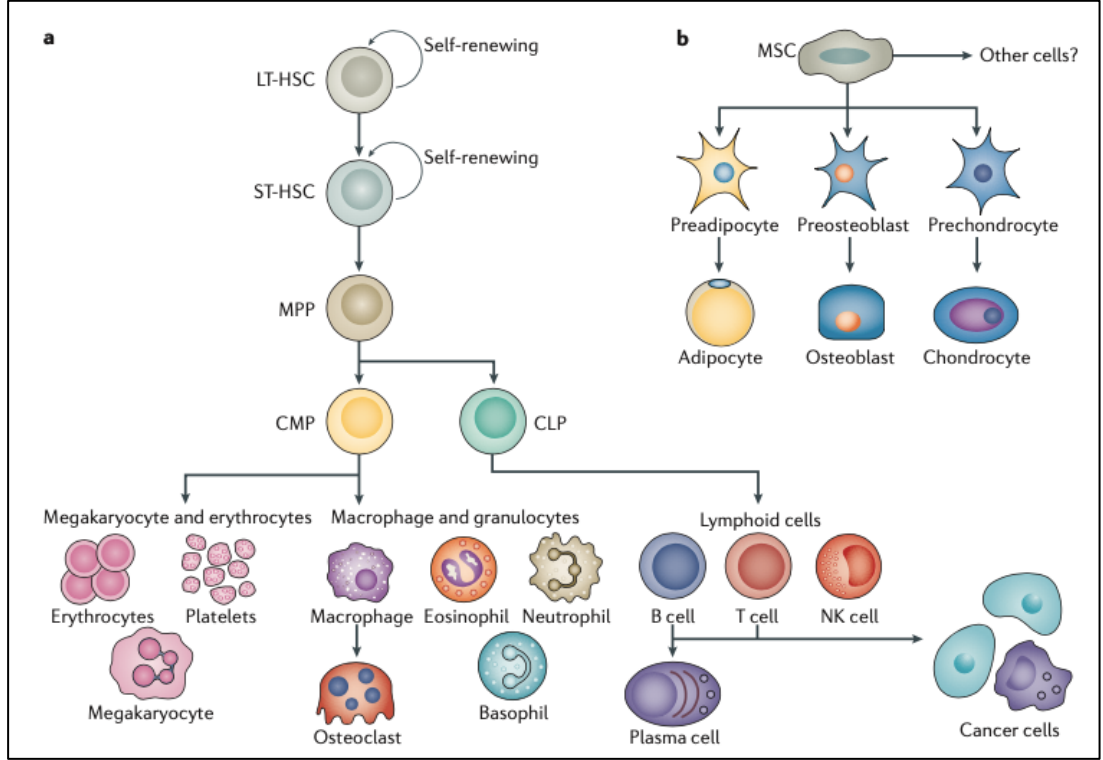
Onkogen olarak tanımlanan DEK yüksek oranda korunmuş nükleer bir proteindir. DEK proteini heterokromatin bütünlüğünün korunması, DNA replikasyonu, DNA hasar duyarlılığı ve onarımı, transkripsiyonel düzenleme, mRNA uçbirleştirilmesi (splicing) gibi birçok hücresel süreçte önemli bir rol oynar. DEK, kromatin mimarisini düzenleme fonksiyonları ile kök hücre proliferasyonu, farklılaşması ve kendini yenileme ile ilişkili sinyal yollarını ve çeşitli transkripsiyon faktörlerini düzenler [Kappes et al., 2011]. Otoimmün hastalıklarda hücre dışı alanda tespit edilen DEK'in kemoatraktan etki gösterdiği anlaşılmıştır [Mor-Vaknin et al., 2006]. DEK'in literatürde bilinen iki izoformundan ilk keşfedileni ve en fazla eksprese olanı DEK izoform 1 (DEK1) üzerine daha yoğun çalışmalar bulunurken DEK izoform 2 (DEK2)'yle ilgili çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Bu tez çalışmasında DEK1 ve DEK2'nin U937 insan pro-monositik hücre hattında ve insan kemik iliği mikroçevresinden türetilen Hs27A stroma hücre hattında aşırı ifadesinin hücre proliferasyonuna etkisi ve bu hücrelerden salgılanıp salgılanmadığı araştırıldı.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Hematopoez

Hematopoetik kök hücreler (HKH) kendini yenileme kapasitesine sahip kemik iliği mikroçevresinde özelleşmiş nişlerde bulunan ve tüm kan hücrelerine (miyeloid, lenfoid ve eritroid) farklılaşabilen multipotent hücrelerdir. Hematopoez (kan hücrelerinin yapımı), bu nişlerde yerleşmiş hematopoetik hücreler, stromal hücreler ve hücreler arası matriks (extracellular matrix (ECM)) bileşenlerinin yer aldığı fizyolojik bir süreçtir. Farklılaşmanın başlangıç evresinde HKH'ler uzun dönem kök hücreden kısa dönem, kendini yenileme özelliğini kaybetmiş hücrelere ve ardından multipotent öncül hücrelere (MÖH) farklılaşmaktadır. MÖH ortak miyeloid (oMÖH) veya ortak lenfoid öncül hücrelere (oLÖH) farklılaşma yeteneğine sahip olan ara formdur. oMÖH megakaryosit, eritrosit, makrofaj ve granülosit hücrelerine farklılaşırken, oLÖH ise lenfoid hücrelere (B, T ve doğal katil hücreler) farklılaşır. [Bernitz et al., 2016], [Seita and Weissman, 2010]. Şekil 2.1'de Hematopoez hücrelerinin şematize edilmiş hali ve hiyerarşik yapısı gösterilmektedir [Reagan and Rosen, 2016].

Osteoblastik nişte yerleşim gösteren HKH'ler ve osteoblastlar yapışma faktörleriyle birbirlerine bağlanarak kök hücrelerin bölünmeyen fazda kalmasına katkıda bulunmaktadır. Uzun dönem bu fazda kalan HKH'ler kendini yenilemek (simetrik bölünme) veya hematopoetik sürecin başlaması için bir öncül hücre oluşturmak üzere (asimetrik bölünme) yılda 4-5 defa uyanırlar, ancak ihtiyaç durumunda bu sayı artmaktadır. Bu sayede, HKH'ler olası mutasyon risklerine karşı kendilerini korumaktadır [Iwasaki and Suda, 2009].



Şekil 2.1: Hematopoezin şematik gösterimi. a) LT-HSC; uzun dönem hematopoetik kök hücre, ST-HSC; kısa dönem hematopoetik kök hücre, MPP; multipotent öncül hücre, CMP; ortak miyeloid öncül hücresi, CLP; ortak lenfoid öncül hücresi. b) MSC; mezenkimal kök hücre.

2.2. Kemik İliği Mikroçevresi ve Hematopoezdeki Önemi

Kemikler iskelet sistemimizin önemli bir parçası olup içi kemik iliği olarak adlandırılan süngerimsi yapıdan oluşmaktadır. Sağlıklı bir yetişkinde sarı kemik iliği olarak bilinen ve yağ depolayan formu çoğunlukta yeni doğanda kan hücreleri üretiminin yüksek olduğu kırmızı kemik iliği vardır [Gurevitch et al., 2009]. Kemik iliği çok çeşitli hücreleri ve bileşenleri bünyesinde barındırır; mezenkimal kök hücreler (MKH), HKH'ler, öncül hücreler (progenitor cell), sinüzoidal endotel hücreler, perivasküler stromal hücreler, adipositler, kemik soy (osteolineage) hücreleri, miyelinsiz Schwann hücreleri, bağışıklık hücreleriyle birlikte çeşitli yapışma faktörleri, büyüme faktörleri ve kemokinler dahil olmak üzere birçok bileşen özel niş yapıları içinde bulunur [He et al., 2014]. İlk olarak Shofield tarafından 1978 yılında önerilen bu niş yapıları kemik iliği mikroçevresi olarak da tanımlanmaktadır [Schofield, 1978]. İki farklı niş bölgesi (osteoblastik (endosteal) ve vasküler), kök hücrelerinin bölünüp bölünmemesini, kendini yenilemesini (self-renewal),

çoğalmasını (proliferation), farklılaşmasını (differentiation) ve göçünü (migration) uyum içinde hareket ederek düzenler [Iwasaki and Suda, 2009], [Perry and Li, 2007]. Bu niş yapılarının oluşumunda katkısı olan mezenkimal/stromal hücreler ve bu mikroçevredeki ECM bileşenleri arasındaki etkileşimler, kan hücrelerinin oluşum sürecini (Hematopoez) salgıladıkları faktörlerin doğrudan veya dolaylı etkileriyle desteklemektedir [Tabe and Konopleva, 2014]. Hematopoetik kök hücrelerden miyelooid ve lenfoid kökenli olarak gelişen yeni kan hücreleri, kemik içinde yer alan gelişmiş kılcal damarlar aracılığıyla dolaşım sistemine katılmaktadır [He et al., 2014].

Kemik iliği stroma hücrelerinin, gelişen kan hücrelerinin tutunabileceği bir zemin oluşturması ve hematopoetik faktörleri sentezlemek gibi önemli fonksiyonları bulunmaktadır. Bu zemini oluşturan hücre türlerine MKH'ler, fibroblastlar, osteoblastlar, adipositler, retiküler hücreler, endotel hücreler dahil olmaktadır [Moore and Lemischka, 2006]. Bu hücreler hematopoetik faktörlerin yanında apoptozla ilgili sinyalleri de sağlamaktadırlar [Pierce et al., 2019].

MKH'ler kararlı öncüllerin ve farklılaşmış hücrelerin heterojen, klonal olmayan bir karışımı olarak tanımlanmaktadır [Squillaro et al., 2016]. Belirli yüzey belirteçlerini (CD105/Endoglin, CD90/Thy-1, CD73, Stro-1, Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM) 1) ifade ederken diğer hücre yüzey belirteçleri (CD45/HLA (lökosit), CD34 (hematopoietik ve endotel), CD14/CD11b (monosit), CD79a/CD19 (B hücresi)) ifadesinin bulunmadığı, süspansiyon halinde bulunmayan, yüzeye yapışarak çoğalan hücrelerdir. MKH, osteoblastlar, adipositler ve kondroblastlar olarak hücrel farklılaşma gösterirler [Dennis and Charbord, 2002], [Dominici et al., 2006]. Klasik olmayan farklılaşmayla, miyoblastik ve hepatositik gibi farklı hücreler de oluşabilmektedir [Crisan et al., 2008], [Snykers et al., 2009].

Kemik iliği stroma hücre kültürlerinin genellikle %50-70'i fibroblastlardan oluşmaktadır. Bu hücreler alfa düz kas aktinine (alpha-smooth muscle actin (ASMA)), CD44 hyaluronat reseptörüne ve β 1 integrinleri (Very Late Antigen (VLA)-1 ve VLA-5) gibi membran yapışma reseptörlerine sahip olmasının yanında laminin, fibronektin, proteoglikan ve kollajenler (tip I, III ve IV) gibi hücre dışı bileşenler de üretmektedir [Wilkins and Jones, 1995], [Ciaffoni et al., 2015]. Fibroblastların granülosit koloni uyarıcı faktör (Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)), granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)), interlekin-6 (IL-6), trombopoietin (TPO) gibi çok çeşitli sitokin ve büyüme faktörü üreterek hematopoez sürecinde önemli roller üstlendiği gösterilmiştir [Guba et al.,

1992], [Guerriero et al., 1997]. Hematolojik maligniteleri olan hastalardan alınan fibroblastların bazı sitokinleri (TGF- β , PDGF, IL-1, bFGF, VEGF) anormal seviyede salgıladığı ve daha yüksek proliferasyon hızına sahip olduğu görülmüştür [Ryningen et al., 2005], [Yonekura et al., 1985].

Mikroçevrede bulunan retiküler hücreler fibroblastlarla en yakından ilişkili olup CD146, VCAM-1, alfa aktinin, lestin, neptin, CXC kemokin ligandı 12 (CXCL12) ve IL-7 ifade eden kemik iliği sinüzoidlerine komşu hücrelerdir. Bu hücreler kan hücrelerini barındıran ağ yapısını uzun retiküler fibrilleriyle oluşturmakta ve olgunlaşan hücrelerin dolaşıma geçmelerini kolaylaştırmaktadır. [Porter and Calvi, 2008], [Sacchetti et al., 2007]. Ayrıca anjiyopoietin-1 üretirerek vaskülogenezi yönlendirip kemik iliğindeki kan damarlarını stabilize etme özelliğine de sahiptirler [Moore and Lemischka, 2006].

Osteoblastlar kemik yapımında osteoklastlarla beraber bulunan MKH'den türeyen transkripsiyon faktörü Sp7/Osterix eksprese eden öncül hücrelerdir [Liu et al., 2013]. G-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-6, makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF), lösemi inhibitör faktörü (LIF), TNF α , VEGF, TGF- β 1 ve hematopoez düzenleyen anjiopoietin-1 üretirler ve hematopoezin kontrolünde HKH'in bölünmeden beklemesinin sağlanması gibi önemli rolleri bulunmaktadır [Arai et al., 2004].

Endotel hücrelerin tek sıra döşendiği sinüsoidler kemik iliği mikrovasküler sistemini ifade etmektedir. Bu hücreler arter/ven damarlarının oluşumunu sağlar, sinüsoidden çıkan veya sinüsoide sızan yapıların hareketlerini kontrol eder. CXCR4 (CXCL12'ye bağlanan kemokin reseptörü), G-CSF, GM-CSF, makrofaj koloni uyarıcı faktör (Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)), IL-6, LIF gibi sitokinleri salgılayan VLA-4, β 1/ β 2 integrinleri ve selektinlerle doğrudan hücre-hücre etkileşimleri gerçekleşmekte ve HKH olgunlaşmasını teşvik etmektedir. [Shiozawa et al., 2008]

Kemik iliği adiposit hücreleri genellikle MKH'lerden türevlenip ilik hacminin oluşmasına ve yaşa bağımlı olarak kırmızı kemik iliğinin yerini alarak sarı kemik iliğine dönüşümü sağlamaktadır [Moore and Dawson, 1990]. Bu hücreler kemik iliğinde bir enerji kaynağı olarak ve sistemik/yerel etkileşimler aracılığıyla onarım gibi süreçlerde önemli rol oynamaktadır. Osteoblastlar ile aynı erken öncül hücreden gelebileceklerine dair bazı çalışmalar mevcuttur [Horowitz et al., 2017]. Akış sitometrisinde Pdgfr α ve Sca1 ekspresyon varlığı ve CD45, CD31 ve CD24 ekspresyon yokluğu ile ayırt edilebilmektedir [Ambrosi and Schulz, 2017]. HKH'leri uyuracak

sitokinler, GM-CSF ve G-CSF gibi bazı büyüme faktörlerini salgılasalar bile hematopoez süreci için diğer hücre tiplerinin uyarıcıları daha etkilidir [Corre et al., 2006]. Diğer yandan hematopoez engelleyici nöropilin-1, lipokalin-2, adiponektin ve TNF α gibi faktörleri salgıladıkları bildirilmiştir [Belaid-Choucair et al., 2008], [Miharada et al., 2008].

Kemik iliği mikroçevresinin bir diğer önemli bileşeni olan ECM; fibronektin ve kollajen gibi önemli glikoproteinler, osteonektin, osteopontin ve laminin proteinleri yanında hiyalüronik asit ve heparin sülfat gibi proteoglikanlardan oluşmaktadır. [Broxmeyer et al., 2005]

Özetle, kemik iliğinde kan hücreleri dışında bulunan tüm bu mikroçevre hücreleri gerek salgıladıkları sitokinler gerekse hücreler arası etkileşimler sayesinde kan hücrelerinin olgunlaşması, immün cevabın oluşması ve düzenlenmesinde önemli role sahiptir. Kemik iliğindeki hematopoetik hücreler ve mikroçevre arasındaki otokrin/parakrin etkileşimin bozulması, kan kanseri de dahil pek çok patolojiyle ilişkilendirilmektedir. Dolayısıyla, mikroçevreden salgılanan faktörlerin tanımlanması ve işlevlerinin altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılması, kan hücrelerinin gerek normal gerekse kanseröz gelişimini anlamak açısından önemlidir.

Bu tez çalışmasında insan kemik iliği stroma hücre hattı olan Hs27A hücrelerini model hücre olarak kullandık. Hs27A hücre hattı, Hs27 hücre hattının bir alt klonudur. Hs27A ve Hs5 hücre hattı aynı sağlıklı donörden türetilen kemik iliği stroma hücreleridir ve insan papilloma virüsü tip 16'nın (HPV16) E6 ve E7 açık okuma çerçevelerini (open reading frame) taşıyan retrovirüs kullanılarak oluşturulan hücre hatlarıdır [Iwata et al., 2014], [Roecklein and Torok-Storb, 1995]. Erken hematopoietik öncül hücrelerin “cobblestone area” (stromada sıkıca örülmüş açılı/köşeli hücreler grubu) oluşumunu Hs27A hücre hattı desteklemektedir [Denning-Kendall et al., 2003], [Kelly et al., 2019]. Hs5 ve Hs27A hücre hatları kemik iliği mikroçevresi çalışmaları ve erken kanser gelişimi/tümör hücre büyümesi çalışmalarında yaygın olarak kullanılsa da işlevsel açıdan ve morfolojik olarak farklılık göstermektedir [Li et al., 2016]. Normalde vasküler endotelial hücreler, retiküler hücreler, düz kas hücreleri ve perisitler tarafından eksprese edilen CD146 (melanoma hücre adezyon molekülü (MCAM), MUC18 ve A32 antijen olarak da bilinir) epitelooid morfoloji gösteren Hs27A hücrelerinde daha homolog olarak bulunurken, fibroblast benzeri Hs5 hücrelerinde negatiftir [Roecklein and Torok-Storb, 1995], [Sorrentino et al., 2008]. CD146⁺ Hs27A hücreleri stromal hücre

kaynaklı faktör-1 (SDF-1 veya CXC-chemokine ligand 12 (CXCL12)), anjiyotensin, osteopontin ve VCAM-1 gibi kök hücre nişi ile ilişkili proteinleri eksprese ederek bir kök hücre nişi yapısına olanak sağlamaktadır [Roecklein and Torok-Storb, 1995], [Sacchetti et al., 2007]. Ayrıca CD146⁺HS27A hücrelerinden elde edilen kültür medyumunu (conditional medium (CM)), CD14⁺ monositlerin makrofaja dönüşmelerini indükleyebilmektedir. CD146⁺ hücrelerin DKK3 ve CDK6 eksprese eden monosit morfolojideki hücrelerle de temas halinde bulunduğu bildirilirken, HKH nişlerini korumak için kemik iliği makrofajlarının da gerekli olduğu bilinmelidir [Iwata et al., 2004], [Winkler et al., 2010]. GM-CSF, G-CSF, IL-6 faktörlerini salgılayan CD146⁺ HS5 hücreleri de CD34⁺ kemik iliği kök/öncül hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlarken, bu hücrelerin medyumunun monosit morfolojisini değiştirmede ancak ek faktörlerin (IL-4 ve TNF α) kullanılmasıyla beraber dentritik hücre fenotipine dönüşümü indüklediği bildirilmiştir [Iwata et al., 2014].

2.2.1. Monosit/Makrofaj Hücrelerinin Yapı ve Fonksiyonları

Bu tez çalışması kapsamında ayrıca insan pro-monosit hücre hattı olan U937 hücrelerini de kullandık. Vücudumuzda monositler, makrofaj ve dentritik hücrelerle beraber mononükleer fagositik sistemin bir parçasıdır [Guilliams et al., 2014], [Jakubzick et al., 2017]. Bu mononükleer fagositler, patojenlere karşı konak savunması ve doku homeostazı gibi birçok temel biyolojik süreçte yer almak üzere kan, kemik, akciğer, karaciğer, dalak, deri ve merkezi sinir sistemi gibi dokularda bulunmaktadır [Kurotaki et al., 2017]. Kanda dolaşan monositler heterojen dağılım göstermekte ve farklı işlevlere sahip monosit tipleri yüzey belirteçlerinin ifadesine göre alt gruplara ayrılabilir [Yang et al., 2014]. CD14 yüzey belirteci ifadesi bulunan monositler, endotel hücrelerden geçiş yapma ve uygun sinyallere yanıt olarak dokulara yerleşme yeteneğine sahip klasik (classical) veya göçmen monositler (migratory monocytes) olarak; CD16 ifadesi bulunan monositler, damar duvarları boyunca devriye gezen ve endotel hücre destek fonksiyonu olduğu düşünülen klasik olmayan monositler (non-classical) veya devriye gezen monositler (patrolling monocytes) olarak bilinmektedir. Dolaşım sistemindeki monositlerin yaklaşık %80-90'ını klasik monositler oluştururken kalan miktarı ara form (CD14⁺CD16⁺) monositlerle birlikte klasik olmayan monositler oluşturmaktadır. [Auffray et al.,

2007], [Ingersoll et al., 2010]. Klasik monositler bir kemokin reseptörü olan CCR2'yi (CC-chemokine ligand 2 (CCL2) reseptörü) ve CD62L (L-selektin) hücre adezyon molekülünü (lenfosit-endotelial hücre etkileşimlerinde önemli rol oynar) yüksek seviyelerde ifade ederken ara form monositler ve klasik olmayan monositler CX3CR1 kemokin reseptörünü yüksek seviyede ifade etmektedir [Ancuta et al., 2003], [Xu et al., 2008]. Klasik monositlerin en önemli fonksiyonu fagositozdur, yüksek peroksidaz aktivitesi sergilerler ve bakteriyel lipopolisakkaritlere (LPS) yanıt olarak yüksek seviyelerde IL-10 ve ROS ile düşük seviyelerde TNF α üretirler. İnflamasyon esnasında klasik ve ara monositler CCR2/CCL2 veya CCR5/CCL5 kompleman çiftlerinin VLA-1/VCAM-1'e bağımlı etkileşimiyle bağlanmakta ve dokuyu istila etmektedir [Cros et al., 2010], [Wong et al., 2011]. Klasik olmayan monositler ise TNF α ve IL-1 β olmak üzere inflamatuvar sitokinler salgılayarak kompleman CX3CR1/CCL3 çiftinin LAF/ICAM-1'e bağımlı etkileşimiyle dokuya geçmektedir. Monositler daha sonra dokuda makrofaja olgunlaşarak Major Histocompatibility Complex (MHC)-I/II yoluyla T hücre reseptörüne kendi antijenini sunmakta ve T hücre aktivasyonuna yol açmaktadır [Yang et al., 2014], [Yona et al., 2013].

Kemik iliğinde HKH'den türevlenen monositlerin doku makrofajlarının ana kaynağı oldukları düşünülse de yakın zamanlarda yapılan araştırmalar dokuda yerleşik veya dokuya özgü makrofajların çoğunluğunun embriyogenez sırasında yolk kesesindeki öncülerden ve sonrasında farklı organlara göç eden fetüs karaciğer monositlerinden geliştiğini göstermiştir [Ginhoux and Guilliams, 2016], [Ginhoux and Jung, 2014]. Böylece bu çalışmalar monositleri “makrofaj ve dentritik hücrelerin olgunlaşmamış öncülü” bakış açısından uzaklaştırmış ve monosit fonksiyonlarına odaklanılmıştır. İnflamasyon esnasında toplanan monositler, çoğunlukla yerleşik makrofajlardan ve dentritik hücrelerden işlevsel olarak farklı monosit türevli hücrelere farklılaşır.[Ginhoux and Guilliams, 2016]

2.2.2. Monosit Farklılaşma Yolağı

Hematopoez süreciyle birlikte klasik monositlerin gelişimi oMÖH'lerden farklılaşarak gerçekleşir. oMÖH'ler granüosit/makrofaj öncül hücresine (GMÖ) ve megakaryosit ve eritrosit öncül hücresine (MEÖ) farklılaşabilme kapasitesine sahip hücrelerdir [Akashi et al., 2000]. Monosit/dentritik öncül hücreleri (MDÖ) ve unipotent ortak monosit öncül hücreleri (common monocyte progenitors (cMoP)) oMÖH veya GMÖ'lerden oluşabilmektedir [Yañez et al., 2017]. Kemik iliğinde GMÖ popülasyonu arasında cMoP bulunduğu tanımlanmıştır [Kawamura et al., 2017]. Kemik iliğinden monositlerin dolaşıma çıkışı, kemokin reseptörü CCR2'nin klasik monositlerde ekspresyonunu gerektirir [Shi and Pamer, 2011]. Klasik monositler kan dolaşımından kaybolmadan önce 1-2 günlük kısa bir ömre sahiptir. Klasik monositler inflamasyon, yaralanma bölgelerine hızla göç ederek önemli fonksiyonel plastisite sergilemekte ve inflamatuvar makrofajlara veya dendritik hücrelere farklılaşmaktadır [Arnold et al., 2007], [Serbina and Pamer, 2006]. CD14 klasik monosit belirtecinin ifadesi farklılaşma esnasında azalmaktadır [Steinbach and Thiele, 1994]. TLR2 başka bir yüzey belirteci olarak makrofaja farklılaşma esnasında ifadesi azalmaktadır [Henning et al., 2008]. Klasik monositlerin hem kandaki klasik olmayan monositlerin hem de dokulardaki monosit türevli hücrelerin öncü popülasyonunu temsil ettiği fikri doğrusal bir farklılaşma modelini işaret etmektedir. Bu doğrusal farklılaşma modelinde klasik monositlerin kan dolaşımında ara form (CD14⁺CD16⁺) monositlere ve klasik olmayan monositlere farklılaştığı kabul edilir [Patel et al., 2017], [Sugimoto et al., 2015], [Zawada et al., 2011].

Bu tez çalışmasında kullandığımız U937 hücre hattı, histiositik lenfoma hücrelerinden elde edilmiş olup olgunlaşmamış monositik hücrelerin çeşitli özelliklerini göstermektedir [Sundstrom and Nilsson, 1976]. U937 hücreleri, THP-1 hücreleri ile karşılaştırıldıklarında daha olgun aşamada bulunmaktadır [Chanput et al., 2014]. U937 hücreleri, vitamin D3, forbol miristat asetat (PMA) ve all-trans retinoik asit (ATRA) gibi çeşitli faktörler aracılığıyla uyarılarak monosit/makrofaj yolu boyunca farklılaşabilir ve işlevsel, çoğalmayan çeşitli makrofaj hücrelerine morfolojik ve fizyolojik olarak olgunlaşabilir [Mendoza-Coronel and Castañón-Arreola, 2016], [Nemati et al., 2019], [Yamamoto et al., 2009]. U937'nin, apolipoprotein E karboksil terminalinden türetilen Epl.B peptid fragmanına maruz kalması dentritik hücre

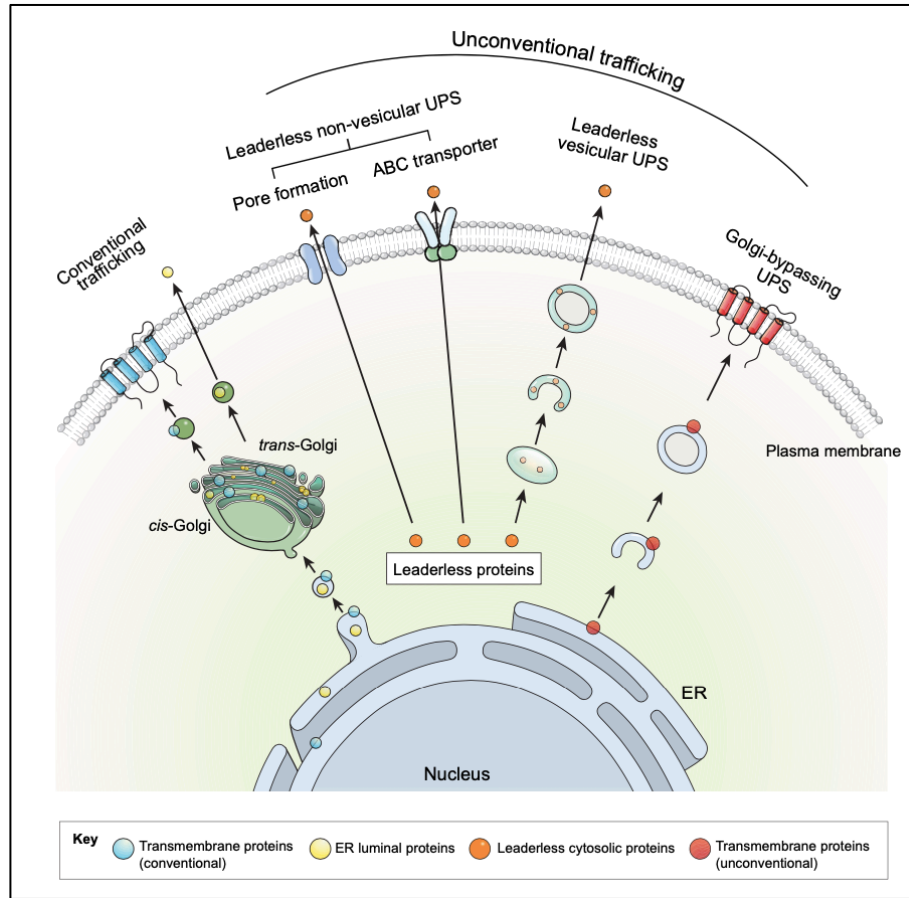
benzeri morfolojiye olgunlaşmasını ve yüzey işaretleyici ekspresyonunu indüklemektedir [Stephens et al., 2008].

Süspansiyon halinde büyütülen U937 hücreleri, mononükleer fagosit sisteminin bir öncüsünü temsil etmektedir ve PMA ile farklılaştırıldıkları zaman bulundukları yüzeye sıkıca tutunarak makrofajlara özgü çeşitli özellikler sergilemeye başlar [Harris and Ralph, 1985]. Makrofajlar bağışıklık sisteminde fagositoz, antijen sunumu ve sitokin üretimi rolleriyle yer alırken yara iyileşmesi, akut ve kronik inflamasyon ve tümör ilerlemesinde de önemli ölçüde katkıları vardır [Morrisette et al., 1999], [Mosser and Edwards, 2008]. U937 hücre hattı monosit ve makrofaj farklılaşmasının mekanizmalarını aydınlatmada, monosit-endotelyum bağlanmasıyla ilgili mekanizmaların araştırılmasında, kan kanseri ve kanser terapötikleri için *in vitro* deneysel model olarak sıklıkla kullanılmaktadır [Liu et al., 2004], [Strefford et al., 2001].

2.3. Sekretom

Şekil 2.2’de özetlendiği üzere proteinlerin salgılanması için çeşitli yollar mevcuttur [Kim et al., 2018]. Ana hatları ile bu yollar klasik/geleneksel “conventional” ve geleneksel olmayan “unconventional” protein salgılanma (UPS) yolları olarak sınıflandırılır. Birçok salgı proteini endoplazmik retikulum (ER) ve Golgi kompleksini içeren geleneksel yolak üzerinden hedef organelere, membrana veya hücre dışı alana iletilmektedir. Son çalışmalarla birçok proteinin geleneksel olmayan yollarla hücre dışı alana ulaştığı anlaşılmıştır. UPS yolları kendi içinde sinyal peptidi taşımayan sitozolik proteinlerin hücre dışına salgılanmasını içeren üç yolak ve sinyal peptidi bulunan transmembran proteinlerin golgi kompleksini bertaraf ederek hücre-yüzey trafiğinin oluşmasıyla beraber dört gruba ayrılabilir [Rabouille, 2017]. Sinyal peptidi taşımayan proteinlerin UPS’in veziküler olmayan sınıfı, plazma membran porları (Tip I) ve ABC taşıyıcıları (Tip II) yoluyla doğrudan hücreden salgılanmasını içerir. Bu UPS yollarını kullandığı bilinen örneklerden biri IL-1 β sitokinidir. Monosit/makrofaj gibi miyeloid hücrelerde üretilen IL-1 β inflamasyon oluştuğunda çeşitli sitokinlerle beraber doğrudan hücrelerden salgılanmakta ve ilk savunma hattını oluşturmaktadır. Çeşitli inflamatuvar hastalıklarda bulunan baskın IL-1 β ve çeşitli pro-inflamatuvar sitokin salgılarının baskılanabilmesi için UPS

yolaklarının hedeflenebileceği önerilmektedir [Martin-Sanchez et al., 2016]. Bir başka örnek lipid porlardan TİP I UPS aracılığıyla geçen merkezi sinir sistemi ve yetişkin nörojenezinin gelişimi için önemli olan fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF2) proteinidir ve çeşitli nörodejeneratif hastalıkta FGF2'nin hedeflenebileceği önerilmektedir [Woodbury and Ikezu, 2014]. Sinyal peptidi taşımayan proteinlerin veziküler sınıfı (Tip III) otofagozomlar, lizozomlar, endozomlar ve eksozomlar gibi membran bağımlı organellerin dahil olduğu UPS yolağıdır. Otofajiyle ilgili veziküler yapılar Tip III UPS'te önemli bir taşıyıcı sınıftır. Tip III UPS'nin belirgin örneği, sinyal peptidi taşımayan nüklear protein High Mobility Group Box 1 (HMGB1)'in hücre dışına salgılanmasıdır. Hücre dışındaki HMGB1 proteini damage-associated molecular patterns (DAMP) ile inflamatuvar yanıtları tetiklemesi, dendritik hücrelerin olgunlaşması, miyeloid hücrelerde proinflamatuvar sitokinlerin üretimi, endotel hücrelerinde hücre yapışma moleküllerinin indüklenmesi ve kanserin ilerlemesi süreçlerinde rol oynamaktadır [Sims et al., 2010].



Şekil 2.2: Protein Salgılama Yolakları.

Çoğu UPS yolağı ER stresi, inflamasyon, besin açlığı ve mekanik stres gibi hücresel stres koşullarında aktive edilmektedir. Birçok hastalığın stres ile ilişkisi göz önüne alındığında, UPS'in düzenlenmesinin aşırı inflamatuvar tepkileri hafifletebilecek potansiyel terapötik yaklaşımlar barındırdığını düşündürmektedir.[Kim et al., 2018]

2.3.1. Veziküller, Kemokinler ve İntegrinler

Hücre dışı veziküller hücre membran yapısından veya endozomal sistemden türevlenen hücreler arası iletişimin önemli araçlarıdır. Hücre dışı veziküller hücresel kökenlerine, boyutlarına ve morfolojilerine göre eksozomlar, mikroveziküller ve apoptotik cisimcikler gibi sınıflara ayrılırlar. Biyolojik sıvılarda bulunarak hem fizyolojik (doku homeostazı, yaşlanma, metabolik düzenleme, egzersiz, stres, sirkadiyen ritimler, hamilelik sırasında moleküler transfer, emzirme, yemek yeme, parazit etkileşimleri, vb.) hem de patolojik (kanser, inflamasyon, metabolik bozukluklar, otoimmünite, nörodejenerasyon, bağımlılıklar, vb.) süreçlerde yer alabilirler. Eksozomlar tüm hücrelerden salgılanan yakın ve uzaktaki hücreler arasında hücre-hücre iletişimlerini DNA, RNA, mikroRNA (miR), proteinler ve sitokinlerin hedef hücrelere taşınmasıyla gerçekleştirir. [Tkach and Théry, 2016]

Sitokinler, bağışıklık cevabını etkileyen ve düzenleyen hemen hemen her hücre tarafından üretilen otokrin, parakrin ve endokrin hücre-hücre iletişimini sağlayan 40 kDa moleküler boyutundan küçük olan salgılanan proteinlerdir. Sitokinler interlökinler, kemokinler veya büyüme faktörleri gibi alt gruplarıyla büyük bir aileyi temsil eder. Sitokinlerin etkileri, hedeflenen hücreye bağlı olduğundan pleiotropik olduğu gibi farklı sitokinlerin aynı etkiyi göstermesi sinerjistik olabildiklerini de gösterir [Charo and Ransohoff, 2006]. Monositler, makrofajlar, dentritik hücreler, nötrofiller, B ve T hücreleri, epitel ve endotel hücreleri IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF α gibi sitokinlerin farklı kombinasyonlarını ifade ederler. [Kany et al., 2019]

Kemokinler düşük moleküler ağırlığa sahip (7-15 kDa) sitokinlerin bir üyesidir. Kemokinler proinflamatuvar sitokinler gibi sinyallere yanıt olarak salgılanır ve monositlerin, nötrofillerin ve lenfositlerin seçici olarak toplanmasında önemli bir rol oynayan kemoatraktan moleküllerdir [Oppenheim et al., 1991]. α -kemokinler olarak bilinen CXC, β -kemokinler olarak bilinen CC, CX₃C, ve C kemokinler olarak N terminalindeki sistein kalıntıları ve konumlarına göre dört sınıfa ayrılır [Rollins, 1997]. Başlıca nötrofil ve granülositlerin kemotaksisini uyaran CXC kemokinler N

terminalinde reseptör bağlanması için önemli Glu-Leu-Arg (ELR) sekansı içerirler. Farklı adlandırmaya maruz kalan IL-8, CXC kemokin ligand 8 (CXCL8) kemokini ve nötrofil aktive edici protein-1 (NAP-1) olarak da bilinir. IL-8 kemokini G-proteinine bağlı reseptörler CXCR1 ve CXCR2 ile etkileşir. IL-8, nötrofillerin kan dolaşımından ayrılmasını ve çevre dokuya girmesini indüklemesinin yanında birçok kemokin gibi hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi, hücre içi Ca^{2+} düzeylerinde değişiklikleri, integrinlerin aktivasyonu, granül proteinlerin salınımını uyarır [Paccaud et al., 1990]. CC kemokin ailesinin ilk keşfedilen ve iyi karakterize edilmiş üyesi monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1 veya CCL2) monositler için güçlü bir kemotatik faktördür, Ca^{2+} akışını ve integrin ekspresyonu dahil olmak üzere kemotaksi ile bağlantılı çeşitli hücreyel olayları uyarır. CCL2 kemokin ailesinin en çok çalışılan üyelerindendir ve otoimmün hastalıklarda potansiyel tedavi hedefi olabileceği bildirilmiştir [Hayashida et al., 2001], [Sørensen et al., 2004]. Monositlerin göçünde farklı kemoatraktant moleküller kullanılır, patern tanıma reseptörleri aktivasyonundan veya sitokin stimülasyonundan sonra, CCL2 ve CCL7 (MCP-3) kemokinleri stromal hücreler ve immün hücreler tarafından hızlıca üretilir. CCL2 hücre dışı matriks glikozaminoglikanları dimerize ederek bağlanır, böylece $CCR2^{+}$ inflamatuvar monositler için stabil bir gradyan oluşturur [Proudfoot et al., 2003]. Erken inflamasyona nötrofiller hâkim olurken, polimorfonükleer lökositleri çeken CXC1 ve CXC8 gibi kemokinlerin baskılanması yoluyla nötrofiller azalır, monositleri çeken CCL2/MCP-1 ve CCL8/MCP-2 gibi kemokinler indüklenir ve sonraki inflamasyon durumlarına monositler hâkim olur [Hurst et al., 2001]. CX₃C kemokin ailesi bilinen tek üyesini CX₃CL1 (veya fraktalkin) temsil eder. Hem membran bağımlı hem de çözünür formda bulunan benzersiz bir kemotaktik faktördür. Fraktalkin reseptörü CX₃CR1, anti-inflamatuvar klasik olmayan monositlerin iyi bilinen bir belirtecidir. Ayrıca pro-inflamatuvar monositlerde bulunabilir ve normal fonksiyonunda rol oynayabilir [Griffith et al., 2014].

Hücre yüzeyinde bulunan integrinler, hücre-hücre ve hücre-hücre dışı matris etkileşimlerinde yer alan hücre mikroçevresi için önemli transmembran reseptörleridir. Aktifleşen monositlerin vasküler endotelyuma yapışması, dolaşımdaki monositlerin göçünü başlatır. İnflamatuvar bir hastalık olan romatoid artrit'te (RA) monositler yapışma molekülleri B1 ve B2 integrinlerini artan düzeyde ifade etmektedir. VLA-4 ve VLA-5 olmak üzere B1 integrinleri endotel yüzeyde bulunan fibronektin ve VCAM-1 ile etkileşime girerek monosit yapışmasına aracı olmaktadır.

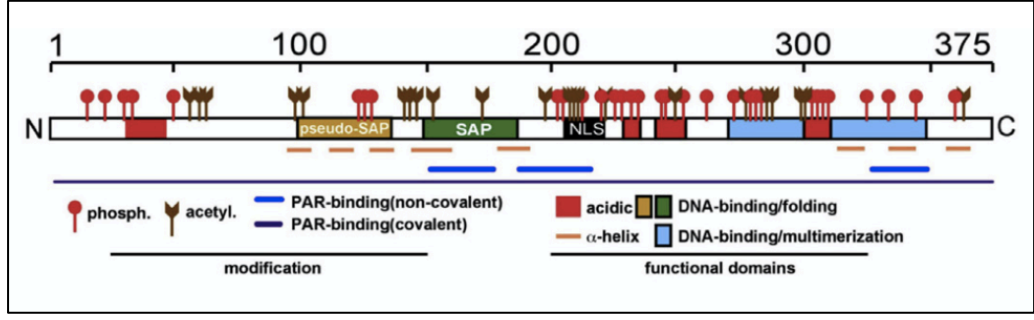
Esasen CD11b olmak üzere CD11a ve CD11c gibi B2 integrinlerini monositler yüksek oranda ifade eder; hücreler arası adezyon molekülü-1 (Intercellular Adhesion Molecule (ICAM) 1 veya CD54), ICAM-2 (CD102) ve ICAM-3 (CD50) endotelial ligandlarıyla etkileşime girerek monositlerin göç sürecini destekler [Lioté et al., 1996].

2.4. DEK Geni

DEK, birçok hücrel sürecin düzenlenmesinde önemli bir role sahip, türler arasında oldukça korunmuş ve insanda 6p22.3 kromozom bölgesinde bulunan *DEK* geninin ürünü nüklear bir kromatin proteindir [Kappes et al., 2001], [Riveiro-Falkenbach and Soengas, 2010], [Waldmann et al., 2004]. *DEK* geni ilk olarak akut miyeloid lösemi (AML) hastalarının bir alt grubunda tekrarlayan 6. ve 9. kromozomlar arası translokasyon (t(6;9)) ürünü kimerik *DEK-CAN* mRNA ve DEK-CAN füzyon proteini aracılığıyla keşfedilmiştir [von Lindern et al., 1992]. Daha sonra juvenil romatoid artrit (JRA), juvenil idiyopatik artrit (JIA), sistemik lupus eritematozus (SLE) ve sarkoidoz gibi çeşitli otoimmün hastalıklarda otoantijen olarak da tanımlanmıştır [Dong et al., 1998, 2000], [Sierakowska et al., 1993], [Wichmann et al., 2000]. Agresif olarak çoğalan malign hücrelerde tercihen eksprese edildiği, apoptoz ve senesens gibi hücrel süreçleri negatif yönde etkileyerek tümör oluşumuna katkı sağladığı düşünülmektedir [Carro et al., 2006], [Lin et al., 2013], [Riveiro-Falkenbach and Soengas, 2010]. AML [Casas et al., 2003], [von Lindern et al., 1992], kronik lenfositik lösemi [Wang et al., 2012], glioblastom [Kroes et al., 2000], retinoblastom [Grasemann et al., 2005], Melanom [Khodadoust et al., 2009], hepatosellüler karsinom [Kondoh et al., 1999; Yu et al., 2016], mesane kanseri [Datta et al., 2011], [Evans et al., 2004], kolon kanseri [Lin et al., 2013] ve göğüs kanseri [Abba et al., 2007] gibi birçok tümör dokusunda DEK'in aşırı ifadesi gösterilmiştir. DEK ifadesinin miyeloid hücrelerine farklılaşma esnasında olgunlaşmamış öncül hücrelerine kıyasla azaldığı belirtilmiştir [Ageberg et al., 2006], [Logan et al., 2015]. Ayrıca DEK; HKH'nin korunmasını, kendini yenilemesini ve popülasyon kapasitelerini arttırırken hematopoietik öncül hücrelerin çoğalmasını azaltarak hematopoezi düzenlemektedir [Capitano and Broxmeyer, 2017].

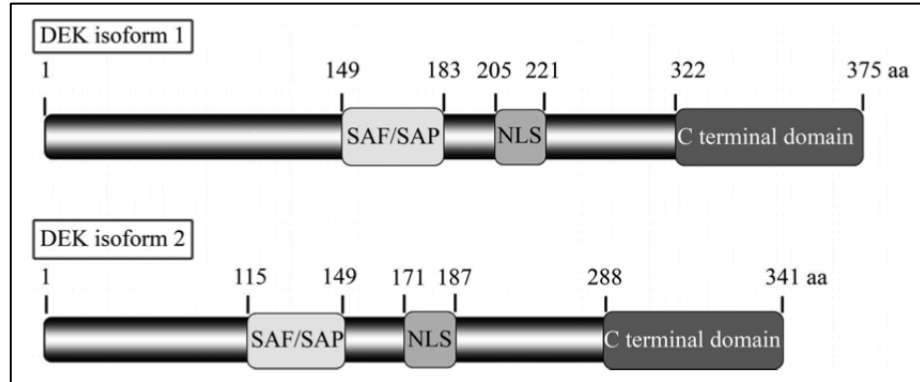
2.4.1. DEK İzoformları

DEK proteininin bilinen iki izoformu mevcuttur. DEK izoform 1 (DEK1) 375 amino asit olmak üzere DEK'in tam uzunluktaki 43 kDa moleküler ağırlığa sahip bir formudur. DEK proteini üzerinde çeşitli bağlanma bölgeleri bulunmaktadır (Şekil 2.3)[de Albuquerque Oliveira et al., 2018]. DEK'in kromatine bağlanmasından sorumlu, DNA'ya süper sarmalları tanıtan 35 amino asitlik SAF/SAP (Scaffold Attachment Factor) bölgesi DEK'in merkezinde olup 149 ve 183. amino asitler arasında bulunmaktadır [Kappes et al., 2004b]. 87-187 amino asitleri arasındaki sekans düz DNA yerine rekombinasyon ve DNA onarımı ile ilişkilendirilen "four-way junction" DNA'sını tercih edip gevşemiş dairesel DNA'da süper sarmalları teşvik eder, 68-87 ve 187-250 amino asitleri arasındaki bitişik sekanslar pozitif süper sarmalların oluşumu için gereklidir [Böhm et al., 2005], [Waldmann et al., 2003]. 78-208 amino asitlerinde bulunan iki DNA bağlanma bölgesi, helix-loop-helix motifine katlanan kapalı çift sarmallı DNA'ya (dsDNA) pozitif süper sarmalları tanıtır [Devany et al., 2008]. 205-221 amino asitleri arasında nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) motifi, 309-375 amino asitleri arasında yapısal olarak E2F/DP transkripsiyon faktörü ailesine homolog DNA bağlanma bölgesi bulunur [Kappes et al., 2001]. Son olarak 270-350 aminoasitleri arasında DNA bağlanma bölgesi ile örtüşen Kazein Kinaz 2 (CK2) tarafından fosforilasyona bağlı multimerizasyon bölgesi bulunur [Kappes et al., 2004a]. Bu bölgelerle beraber IL-8 ve MIP2 gibi CXC kemokinlerinde bulunduğu bahsedilen ve reseptör bağlanması için önemli ELR sekansına DEK'in de sahip olduğu belirtilmiştir [Mor-Vaknin et al., 2006]. Özetle, DEK proteinin uğradığı post translasyonel modifikasyonlar (fosforilasyon, asetilasyon veya ADP-ribosilasyon) DEK'in DNA'ya bağlanma afinitesini etkiler [Kappes et al., 2004a].



Şekil 2.3: DEK'in DNA bağlanmasında yer alan fonksiyonel bölgeleri ve post translasyonel modifikasyonlarının şematik yapısı.

DEK izoform 2 (DEK2), pozitif DNA süper sarmal aktivitesi için gerekli olan 49-82 amino asitlerinin eksik olduğu alternatif uç birleştirme ile oluşturulan kısa bir formudur (Şekil 2.4) [Privette Vinnedge et al., 2013], [Teng et al., 2017]. Çoğu araştırma DEK1'in normal dokularda ve kanserde olası işlev ve mekanizmalarına odaklanmıştır. Kısıtlı da olsa bazı çalışmalar DEK2'den bahsetmektedir. DEK2'nin aşırı ekspresyonu daha az etkili olmasına rağmen DEK1 aşırı ekspresyonu gibi hepataselüler karsinom (HCC) hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü desteklemiştir [Yu et al., 2016].



Şekil 2.4: DEK izoformlarının şematik yapısı. DEK izoform 2'de 49-82 amino asitleri arasındaki ekzonlar eksiktir. SAF/SAP, Scaffold Attachment Factor motif; NLS, nükleer lokalizasyon dizisi.

2.4.2. DEK'in Fonksiyonları

DEK proteini “uzun dönem hematopoietik kök hücreleri”nin korunmasına ve kendini yenilemesine katkıda bulunurken [Broxmeyer et al., 2012], CD34⁺ öncül hücrelerinin farklılaşmasını uyarak granülositik hücre kolonilerinin oluşmasında da rol oynar [Koleva et al., 2012], [Logan et al., 2015].

DNA üzerinde farklı yapısal bölgelerde lokalize olabilen DEK, DNA topolojisinde [Waldmann et al., 2003], heterokromatin protein 1 α (HP1 α) ile doğrudan etkileşimiyle H3K9me3 histonuna bağlanmasını arttırarak heterokromatin yapısının korunmasında pozitif düzenleyici ve promotörlerin yakınında bulunan H3K9me3 histonunu azaltarak epigenetic silencing loop oluşumunda [Kappes et al., 2011], histon asetiltransferaz (HAT) enziminin aktivitesini bozarak transkripsiyonun baskılanmasında ve AP2- α proteininin DNA'ya bağlanmasını arttırarak transkripsiyonun aktivasyonunda [Kappes et al., 2004b], çift zincir kırıklarının (DSB) onarımında görevli RAD51 ile kompleks oluşturarak homolog olmayan uç birleşmesi (NHEJ) sürecinde [Smith et al., 2017] yer alarak DNA transkripsiyonu ve onarımı dahil olmak üzere çeşitli nükleer işlemlerde yer almaktadır.

2.4.3. Hücre Dışına Salgılanan DEK

Nüklear bir protein olan DEK'in post translasyonel modifiyasyonlar sonucunda DNA bağlanma kapasitesinin azaldığı ve DNA hasarı, apoptoz ve inflamasyon durumlarında hücreler tarafından salınabildiğine dair ilgi çekici bulgular vardır. DEK, apoptoza giden hücrelerden pasif olarak salgılanmasının yanında monositlerin, monositlerden türetilmiş makrofajlara (Monocyte derived macrophages, MDM) farklılaştırılmasıyla beraber DEK'in önemli oranda hücre çekirdeğinden ayrılarak sitoplazmaya geçtiği ve oradan da eksozomlar veya golgiden bağımsız yolla serbest formda aktif olarak salgılandığı gösterilmiştir [Mor-Vaknin et al., 2006]. CK2 fosfarilasyonu ve Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1 (PARP1) poli ADP-ribosilasyonu ile kromatinden ayrılan DEK'in hücre dışına salınımının IL-8 ile uyarıldığı ve bu sürecin immünbaskılayıcı ajanlar (deksametazon ve siklosporin A) tarafından baskılandığı gösterilmiştir [Kappes et al., 2004a], [Mor-Vaknin et al., 2006]. Ayrıca DEK ve DEK otoantikorları JIA hastalarının sinavyal sıvısında tespit edilmiştir ve bu

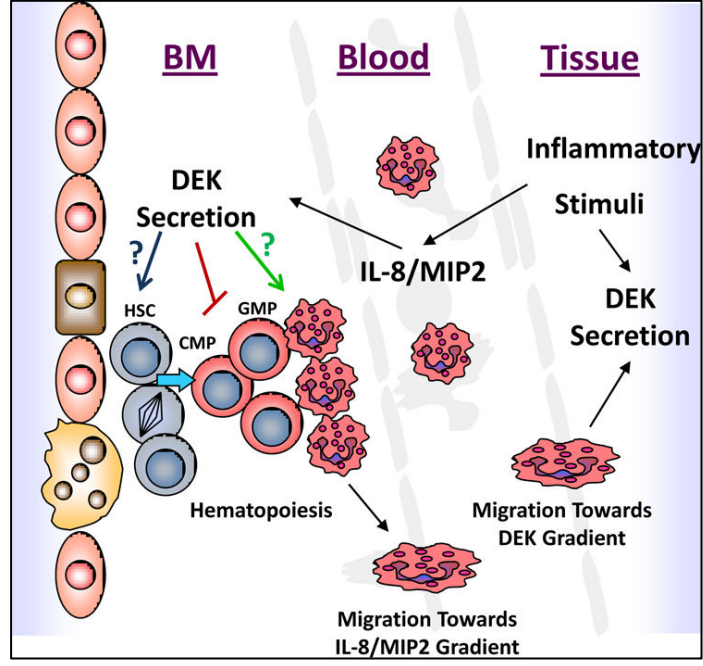
serbest formunun otoimmün hastalıklarda nötrofiller, sitotoksik T hücreleri ve doğal katil hücreler için kemoatraktant olarak etki gösterdiği, eksozomlarla salınımının ise otoimmünite ile ilişkili olduğu belirtilmiştir [Dong et al., 1998], [Mor-Vaknin et al., 2006], [Wichmann et al., 2000].

Bir başka çalışmada DEK ifadesi baskılanmış hücrelerde görülen kromatin yapısındaki ve DNA tamir mekanizmalarındaki bozuklukların besiyerine eklenen rekombinant DEK aracılığıyla yeniden düzenlendiği gözlenmiştir. HSPG bağımlı bir mekanizmayla hücre içine alınan rekombinant DEK nüklear lokalizasyon göstererek endojen DEK'in hücre içi aktivitelerini gerçekleştirmiştir. [Saha et al., 2013]

Erken evredeki mesane kanserlerinde DEK'in aşırı ifade edildiği gözlenmiş ve sonucunda mesane kanseri hastalarının idrarında DEK tespit edilmiştir. Pilot bir çalışma olsa da mesane kanserinin erken teşhisi için DEK'in biyobelirteç olarak kullanılabileceği önerilmiştir [Datta et al., 2011].

JIA hastalarının sinoviyal nötrofillerinden, makrofajlar ve T hücreleri gibi hücre dışı boşluğa DEK'in salgılandığı bir başka çalışmada tespit edilmiştir. Nötrofiller; PMA, IL-8 veya LPS aktivasyonu sonucu granül proteinlerini ve kromatini serbest bırakarak patojenleri bağlayan Neutrophil Extracellular Traps (NETs) oluşturmaktadır. DEK ifadesi silinen bir hayvan modelinde NETs oluşumunun inhibe olduğu görülürken uygulanan rekombinant DEK ile NETs oluşumunun daha sitoplazma ve çekirdeğe ulaşmadan tamamlandığı, DEK hedefli DNA aptamerlerinin uygulanması sonucunda da NETs oluşumunun belirgin seviyede engellendiği bildirilmiştir. İnflamasyonun önemli bir aracısı gibi görünen DEK, doğuştan gelen bağışıklığı ve otoantikorların oluşumunu düzenleyen NETs yapıları için gereklidir. [Mor-Vaknin et al., 2017]

Hücre dışı DEK, erken miyeloid öncül hücrelerin proliferasyonunu negatif etkilerken, olgun miyeloid hücrelerin farklılaşması üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir. Ancak granülositik farklılaşmayı artırıp artırmayacağı veya endojen DEK gibi HKH fonksiyonunu değiştirip değiştiremeyeceği bilinmemektedir. Granülositler gibi bazı hematopoetik hücreler, salgılanan DEK'e doğru göç ederler. İnflamatuar uyaranlar hücre içi DEK konsantrasyonlarını ve hematopoietik kökenli hücreler tarafından DEK salgılanmasını düzenler. İnflamasyon ve bağışıklık tepkisinde önemli olan NF- κ B sinyal yolağının aktivasyonu, DEK tarafından IL-8 gibi inflamatuvar moleküllerin üretimindeki değişikliklerle düzenlenir (Şekil 2.5). [Capitano and Broxmeyer, 2017]



Şekil 2.5: Hücre dışı DEK'in Hematopoez ve İnflamasyonda Olası Rollerini.

Hematopoezde DEK'in ekspresyonu, fonksiyonları (proliferatif etki, hücre farklılaşması), salgılanması, otoimmün hastalıklardaki rolleri ve hematopoetik kanserlerdeki artan ifadesi DEK'in terapötik potansiyel bir hedef olacağı kanısını desteklemektedir.

DEK'in çözünür formunun sitokin/kemokin benzeri aktivite aracılığıyla hematopoez üzerindeki etkileri olduğuna dair güçlü kanıtların tespitiyle beraber *in vitro* model olarak kullanılan Hs27A ve U937 hücrelerinden DEK'in salgılanıp salgılanmadığının belirlenmesi gerekli hale gelmiştir. Bu tez çalışmasında bilinen DEK izoformlarının aşırı ifadesi model hücre hatlarında sağlandıktan sonra proliferasyona etkisi, lokalizasyonu ve hücre dışı alandaki varlıkları araştırılmıştır.

3. MATERYAL

Tablo 3.1: Cihazlar.

Ürün	Firma	Katalog Numarası
Chemi Doc XRS+	Biorad	721BR04545
CO ₂ İnkübatör	Heal Force	HF90
Countess Hücre Sayım	Invitrogen	1754B
Çalkalayıcı	Labnet	S2025-B-230V
Etüv	VWR	466-3510
FACS Jazz	BD	655487
Floresan mikroskobu	Nikon	Eclipse Ti-S
Flow Sitometri	BD	Accuri C6
Isıtıcı blok	Benchmark	BSH1002-E
Işık mikroskobu	Nikon	Eclipse, E100
Konfokal Mikroskop	Zeiss	LSM 880
Laminar Akım Kültür Kabini	Cryste	Puricube 1200
Micropipet Seti	Gilson	F167300
Mini Santrifüj	Hitachi	CT15RE
Multi rötor	Biosan	Multi RS-60
Pipet Gun (Gilson)	Capp	CAPP PA-100
Santrifüj	Labogene	ScanSpeed 1580R
Santrifüj	Sigma	1-14
Sıvı azot tankı	Taylor Wharton	LS4800
Sonikasyon Cihazı	Branson	BBR02110512
Su banyosu	Wisd Lab. Ins.	0400702135J036
Transblot Transfer Sistemi	Biorad	170-4155
Ters Floresan mikroskobu	Nikon	Eclipse 80i
Ters Işık mikroskobu	Nikon	Eclipse TS100
Multiscan FC	Thermo Scientific	357-701180
Varioskan	Thermo Scientific	3001-1571
Worteks	VWR International	444-1372

Tablo 3.2: Sarf Malzemeler.

Ürün	Firma	Katalog Numarası
6 / 96 kuyulu plaka	TPP	92006 / 92096
96 kuyulu İmmün plaka	Sigma-Aldrich	M9410-1CS
Amicon Ultra-4 Filtre	Millipore	UFC801024
Amicon Ultra-15 Filtre	Millipore	UFC901024
Countes Slides	Nanoentek	EVE EVS-50
Eppendorf Tüp	Axygen	MCT-060-C, MCT-150-C
Falkon 15 / 50 ml	Capp	510015 / 510050
Filtre/Cell Strainer (40µm)	BD	352340
Filtreli Pipet ucu	Nest	314016, 315016, 312012
Flask 25 / 75 cm ²	TPP	90026 / 90076
Hazır Western Blot BOLT Jel	İnvitrogen	NW00100BOX
Hazır Western Blot Jeli	Biorad	456-1034
Hücre Kazıyıcı	Fisher Scientific	
Kriyotüp	Nest	607001
Lam SuperFrost® Menzel	Thermo Scientific	10118091
Lamel (20x20mm)	Isolab	401005151
Mr. Frosty	Nalgene	5100-0001
Nitroselüloz Membran	Biorad	1620112
Parafilm	Isolab	058.01.001
Petri (100 mm)	TPP	93100
Pipet ucu	Nest	301006, 302106, 303206
PVDF Membran	Biorad	1620177
Serolojik Pipet	Capp	SP-02-C, 05-C, 10-C,25-C
Şırınga ucu filtre (0.22 µm)	TPP	99722
Şırınga ucu filtre (0.45 µm)	TPP	99745
Thoma Lamı	Isolab	I.075.03.002
Western Blot Mini Jel Tank	Thermo Scientific	A25977
Western Blot Transfer Modül	Thermo Scientific	B100
Yapışkan Film	Applied	4306311

Tablo 3.3: Kullanılan Kimyasallar ve Kitler.

Ürün	Firma	Katalog
4X Laemmli SDS Tamponu	Biorad	161-0747
4X Bolt LDS Tamponu	Thermo Scientific	BT0007
10X Denatürasyon Tamponu	Thermo Scientific	BT0009
10X TBS	Biorad	1706435
10X Yürütme Tamponu	Biorad	161-0732
20X Transfer Tamponu	Thermo Scientific	BT0006
20X MES Yürütme Tamponu	Thermo Scientific	BT0002
Absolut Etanol	Isolab	9.200.262.500
Aseton	Sigma-Aldrich	24201-2.5L-R
Beta-mercaptoethanol	Applchem	A1108.0100
BSA	Sigma-Aldrich	A2153-10G,50G
Calcium Chloride Dihyd.	Sigma-Aldrich	C7902-500G
EDTA	Sigma-Aldrich	E5134-500G
Formaldehit (%37)	Teknokim	TK.060162.05000
Isopropanol	Isolab	9610232500
Kemiluminisan (ECL)	Advansta	K-12045-D50
Kemiluminisan (ECL)	Thermo Scientific	32132
Kloroform	Sigma-Aldrich	24216-2.5L-R
Marker	Thermo Scientific	26616
Metanol	Sigma-Aldrich	32213-2.5L
MycoPlasma Detection Kit	İntron	25237
NaCl	Sigma-Aldrich	S7653-250G
NP-40	Applchem	A1694,0250
Parafolmaldehid (PFA)	Sigma-Aldrich	P6148-1KG
PBS	Gibco	14190094
Pierce BCA Pro.Ass.Kit.	Thermo Scientific	23227
Proteaz/Fosfataz	Ambion	2551G
Proteaz İnhibitör	Sigma-Aldrich	11873580001
SDS	Sigma-Aldrich	L3771-100G
Sodium Chloride	Sigma-Aldrich	S7653-250G
Sodium deoxycholate	Sigma-Aldrich	D6750-10G
Sodium Phosphate Di.	Sigma-Aldrich	S7907-100G
Substrat Tableti	Sigma-Aldrich	S0942
Trizma Base Reagent	Sigma-Aldrich	T1503-1KG
Triton X-100	Isolab	I.602.32.001
Tween-20	Sigma Aldrich	P9416-100ML
Vectashield Mounting Medyum	VectorLab	H-1200

Tablo 3.4: Hücre Kültür Malzemeleri.

Ürün	Firma	Katalog Numarası
CaPO ₄ Transfeksiyon Kiti	Promega	E1200
DMEM	Gibco	41966029
DMSO	Fisher Scientific	BP231-100
FBS	Gibco	10270106
HEPES	Sigma-Aldrich	H4034-25G
IL-8	R&D	208-IL-010/CF
PBS	Gibco	14190094
Penicilin/Streptomycin	Gibco	15140122
PMA/TPA	Sigma-Aldrich	P1585-1MG
Polybrene	Sigma-Aldrich	H-9268
Poly-L-Lysine	Merck	P5899-5MG
RPMI 1640 Medium	Gibco	52400025
Tryphan Blue	İnvitrogen	T10282
Trypsin	Gibco	25300054

Tablo 3.5: Hücre Hatları.

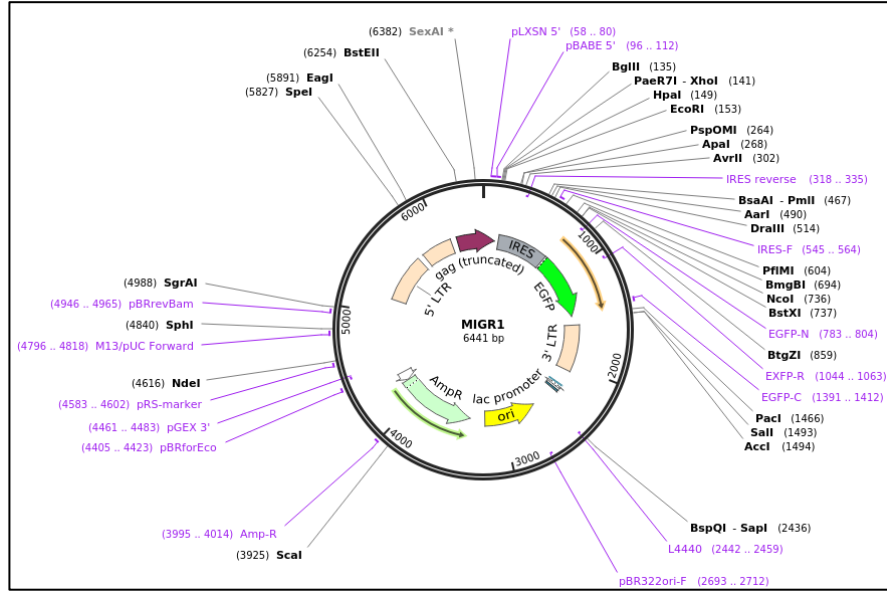
Hücre Hattı	Firma	Katalog Numarası
293T	Dr. Gerard Grosveld	-
Hs27A	ATCC	CRL-2496™
U937	Dr. Gerard Grosveld	-

Tablo 3.6: Primer ve Sekonder Antikorlar.

	Hedef	Klon	Host	Firma	Katalog Numarası
Primer	Anti-İnsan MYC	9B11	Fare	CST	2276S
	Anti-İnsan MYC	71D10	Tavşan	CST	2278S
	Anti-İnsan DEK	2/DEK	Fare	BD	610948
	Anti-İnsan DEK	-	Tavşan	Bethyl	A301-335
	Anti-İnsan IL6	6708	Fare	R&D	MAB206
	Anti-İnsan GAPDH	D1GH11	Tavşan	CST	5174S
Sekonder	Anti-Fare-HRP	N/A	Keçi	CST	7076S
	Anti-Tavşan-HRP	N/A	Keçi	CST	7074S
	Anti-Tavşan-A555	N/A	Keçi	CST	4413S
	Anti-Fare-AP		Keçi	Sigma	A3562
	Anti-Tavşan-AP		Keçi	Sigma	A3687

Tablo 3.7: Plazmitler ve Vektörler.

Ürün	Firma	Katalog Numarası
MIG Retroviral Vektör	Addgene	27490
Paketleme plazmitleri	Dr. Gerard Grosveld	-



Şekil 3.1: MIG Retroviral Vektörün Haritası.

DEK izoformları ifadesinin artırılması için kullanılan plazmitler daha önce laboratuvarımızda yapılan çalışmada Addgene'den temin edilen retroviral formattaki MIG (#27490) vektörüne Myc epitopu (N-EQKLISEEDL-C) içeren DEK1 ve DEK2 klonlanarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1) (<https://www.addgene.org/27490/>).

Tablo 3.8: Kullanılan Çözeltiler.

Çözelti	İçerik
RIPA Liziz Tamponu	150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH 8], %1 NP-40, %0.5 Sodium Deoxycholate, %0.1 SDS
Triton X-100 Liziz Tamponu	150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH 8-8.8], %1 Triton X-100, %0.1 SDS
10X Transfer Tamponu	250ml; 36g Glycine, 7.55g Trizma Base
Kaplama Tamponu	500 ml, pH 9.6; 2.88 g NaHCO ₃ , 1.66 g Na ₂ CO ₃
10X Substrat Buffer	100 ml, pH 9.8; 7.51 g Glycine, 203 mg MgCl ₂ , 136 mg ZnCl ₂

4. METOT

4.1. Hücre Kültürü

İnsan kemik iliği hücre hattı Hs27A ve insan monosit öncül hücre hattı U937, sıvı azot tankından çıkarıldıktan sonra kısmen eritildi ve kültür ortamında 12 ml RPMI 1640 büyüme besiyeri (%10 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin (P/S) ilave edilmiş) eklendi, 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant (üst sıvı) uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti RPMI 1640 büyüme besiyeri ile süspanse edilip T25 veya T75 flaska ekildi, %5 CO₂, 37°C'de çoğaltılarak canlılıkları devam ettirildi. Hs27A hücre hattı flaskaları %80-90 kapladığında besiyeri uzaklaştırıp hücreler PBS ile yıkandı ve 1X Tripsin eklenip 37°C inkübatörde 2 dakika inkübasyon sonunda hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması sağlanıp 1/3 dilüsyonla pasajlandı. Süspanse hücre hattı U937, maksimum 2x10⁶ hücre/ml olduğunda 1x10⁵ hücre/ml olarak pasajlandı. 293T hücre hattı sıvı azot tankından çıkarıldıktan sonra aynı şekilde çözülde, DMEM besiyeri (%10 FBS ve %1 P/S) kullanılarak süspanse edildi ve %5 CO₂, 37°C inkübatörde çoğaltılıp 100 mm kültür petri kabında retrovirüs üretilebilmesi için paketlenme hücre hattı olarak kullanıldı.

Hücre stokları oluşturabilmek için Hs27A, U937 ve 293T hücreleri santrifüj edildikten sonra soğuk dondurma besiyeri (%10 DMSO içeren FBS) ile 3-5x10⁶ hücre/ml olacak şekilde süspanse edilip cryo tüplere aktarıldı ve kademeli soğuyarak hücrelerin sağlıklı şekilde dondurulmasını sağlayan kaplar içinde (Nalgene, Mr. Frosty, Sigma Aldrich) bir gün -80°C'de kaldıktan sonra hücreler sıvı azot tankına (-196°C) aktarılarak uzun süre muhafaza edilmesi sağlandı.

4.2. Mikoplazma Kontrolü

Mikoplazma (Mycoplasma) kontaminasyonunun test edilmesi amacıyla "e-Myco™ plus Mycoplasma PCR Detection Kit (25237, İntron)" temin edildi ve üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Kitin kaynatma metoduna göre 1.5 ml'lik ependorf tüp içine 1.1x10⁵ hücre olacak şekilde süspansiyon hazırlandı. Daha sonra ependorf tüp mikrosantrifüjde 10~15 saniye döndürüldü ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler 1 ml steril PBS çözeltisi içinde süspanse edildi, kısaca

döndürüldükten sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve bu şekilde 2 kez yıkama yapıldı. Hücre pelletleri 100 µl steril PBS içinde yeniden süspanse edildi. Örnekler 10 dakika 95°C'ye maruz bırakıldı ve 5~10 saniye vortekslendi. Ardından örnekler oda sıcaklığında 13.000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüjlendi. Süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı ve PCR için kullanıldı.

Uygun sayıda Mycoplasma PCR Premix tüpünün içine 15 µl DNase/RNase içermeyen su eklendi. Her tüpe 5 µl ilgili DNA örneği eklendi. Kitin içinden çıkan pozitif kontrolden 1 µl kullanıldı. PCR tüpünün içindeki mavi pellet çözöldükten sonra PCR gerçekleştirildi. PCR bitiminde örnekler hazırlanan agaroz jelle 5 µl olarak yüklendi ve 100 V'da elektroforez gerçekleştirildi. Görüntüleme cihazında hücrelerde herhangi bir kontaminasyon olmadığı doğrulandıktan sonra jel UV ışığa 10 dakika maruz bırakılıp atıldı.

4.3. Hücrelerin DEK1 ve DEK2 Aşırı İfadesi için Retrovirüs Üretilmesi ve Transdüksiyon

4.3.1. Transfeksiyon

Transfeksiyon işlemi için DMEM besiyeri (%10 FBS ve %1 P/S) ilave edilmiş) kullanılarak 37°C, %5 CO₂'de kültür edilen 293T hücre hattı kullanıldı. Hücreler transfeksiyondan bir gün önce 100 mm'lik petrilere 2×10⁶ hücre /10 ml olacak şekilde DMEM büyüme besiyeri kullanılarak ekildi.

DEK'in aşırı ifadesi için plazmit transfeksiyonu, her petri için Tablo 4.1'de belirtilen retroviral plazmit kullanılarak Promega kalsiyum fosfat transfeksiyon kit'inin (E1200, Promega) önerdiği şekilde uygulandı.

Tablo 4.1: 293T hücrelerinin transfeksiyonunda kullanılan retroviral vektörler ve miktarları.

	MSCV-GFP (Neg Kontrol)	MSCV-MYC- DEK1-IRES- GFP	MSCV-MYC- DEK2-IRES- GFP	Total Kons.
ddH₂O	422 µl	422 µl	422 µl	-
Plasmit (1 µg/µl)	10 µl	10 µl	10 µl	10 µg
Retro Gag/Pol (Paketleme Vektörü)	4 µl	4 µl	4 µl	4 µg
Retro VsV-G (Paketleme Vektörü)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µg
CaCl₂	62 µl	62 µl	62 µl	-

Transfeksiyondan 18 saat sonra petrilerdeki medyum uzaklaştırıldı. Her petri 5 ml PBS ile hücrelerin yüzeyden kalkmamasına dikkat edilerek iki defa yıkandı ve her bir petriye 5 ml taze RPMI büyüme besiyeri (55°C’de su banyosunda 1 saat inaktive edilmiş %10 FBS, %1 P/S) eklenerek hücreler 37°C / %5 CO₂’de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda transfeksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediği floresan mikroskop (Eclipse Ti-S, Nikon) ile tespit edildi ve GFP pozitif hücreler gen ürünüyle birlikte ifadesi gerçekleştiği için transfeksiyonunun başarılı olduğunu gösterdi. Ardından virüs içeren medyum petrilerden toplanıp 0.45 µm’lik steril filtreden (4614, Life Sciences) geçirildikten sonra U937 hücrelerin infekte edilmesi (transdüksiyon) için kullanıldı.

4.3.2. Transdüksiyon

Transdüksiyonun 24 saat öncesinde U937 hücreleri 1×10⁶ canlı hücre olacak şekilde T25 flasklara 5 ml taze medyumda (RPMI %10 FBS + %1 P/S) ekildi. Bir önceki adımda elde edilen virüs içeren medyuma 8 µg/ml konsantrasyon olacak şekilde polybrene (H-9268, Sigma) eklendi. U937 hücrelerinden eski medyum santrifüj edilerek uzaklaştırıldı ve hücre pelleti 5 ml hazırlanan virüs besiyerinde çözülüp T25 flaska ekildi. İnfekte edilen hücreler inkübatöre (%5 CO, 37°C) kaldırıldı. Aynı gün akşam saatlerinde ikinci enfeksiyon, ertesi gün sabah üçüncü enfeksiyon ve akşam dördüncü enfeksiyon olarak aynı işlem tekrarlandı. 3. gün PBS ile yıkanan hücrelere taze büyüme besiyeri eklenerek hücrelerin kültürde devamlılığı sağlandı.

4.4. Transdükte Olmuş Hücrelerin Akış Sitometrisi ile Ayırıştırılması

GFP analizi, transdüksiyondan 48 saat sonra 'BD Accuri' cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla, hücreler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. 1ml PBS ile çözülen hücreler 40 µm'lik filtreden geçirildi ve elde edilen hücrelerdeki GFP oranı analiz edildi. Ardından GFP pozitif ve GFP negatif hücreler akış sitometrisi (FACS Jazz, 655487, BD) kullanılarak ayırıştırıldı. Hücrelerin birbirinden ayırıştırılması işleminde hücre grubundan yaklaşık 3×10^7 hücre santrifüj edildi ve üzerine %2 BSA (A2153-10G, Sigma) ve 4 mM EDTA (BP118-500, Fisher Chemical) içeren 10 ml PBS (Ayırıştırma solüsyonu) eklendikten sonra 40 µm'lik filtreden (352340, BD) geçirildi. GFP pozitif hücrelerin FACS sonrasında -20°C'de dondurulmuş %50 FBS içeren 1 ml RPMI 1640 medyum içeren falkonda toplandı. Toplanan hücreler 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve 12 kuyulu plakaya RPMI 1640 besiyeri (%10 FBS, %1 P/S) kullanılarak ekildi, hücrelerin kültürde devamlılığı sağlandı.

Akış sitometrisiyle ayırıştırma sonucunda, ayrıca eksprese olan GFP proteinine ilave olarak, N-terminal ucuna Myc epitopu eklenmiş DEK1 veya DEK2 proteinlerini aşırı olarak eksprese eden, Hs27A-GFP, Hs27A-MycDEK1-GFP (Hs27A-MD1), Hs27A-MycDEK2-GFP (Hs27A-MD2), U937-GFP, U937-MycDEK1-GFP (U937-MD1) ve U937-MycDEK2-GFP (U937-MD2) hücreleri elde edildi. Yeterli GFP pozitif orana ulaşılan kadar hücreler akış sitometrisi ile belirli kültür aralıklarından sonra birkaç kez daha ayırıştırıldı. Çoğaltıldıktan sonra hücreler hücre kültürü metodu bölümünde anlatıldığı şekilde dondurularak saklandı.

4.5. Western Blot

4.5.1. Protein İzolasyonu

Hücrelerden total protein örneği toplanırken iki farklı yaklaşım kullanıldı.

Metot 1: 3×10^6 canlı hücre 1500 rpm'de 5 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında hücreler 5 ml soğuk PBS ile çözülerek yeniden 1500 rpm'de 5 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Pellete 99 µl RIPA Liziz tamponu ve 1 µl proteaz/fosfataz inhibitörü (2551G, Ambion) eklenerek örnekler 30 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Örnekler sonikasyon cihazı ile sonike edildikten sonra 13000 rpm'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Süpernatant yeni ependorflara aktararak protein örnekleri elde edildi.

Metot 2: 1×10^6 canlı hücre 100 mm petri kabına ekildikten sonra hücrelerin petri kabını %90 kaplaması beklendi. Hücreler 2 ml soğuk PBS ile yıkandıktan sonra hücrelerin üzerine Triton X-100 Liziz tamponu ve proteaz inhibitörü (11873580001, Sigma) eklendi. Örnekler gece boyu -20°C'de bekledikten sonra 10 dakika 4°C'de bekletilip hücre kazıyıcı ile petri yüzeyinden toplandı. Ependorf tüplere aktarılan örnekler sonike edildikten sonra 13000 rpm'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Süpernatant yeni ependorflara aktararak protein örnekleri elde edildi.

4.5.2. Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein miktarı Pierce BCA Protein Assay Kiti (23227, Thermo) ve firma tarafından tavsiye edilen metot kullanılarak tespit edildi. Kısaca; 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna 50:1 oranında karıştırılan A ve B çözeltisinden 200 µl ve konsantrasyonunu bildiğimiz standartlardan 25 µl eklendi. Alüminyum folyo ile üzeri kaplanan plaka, 37°C çalkalayıcı üzerinde 30 dakika inkübe edildi ve Varioskan cihazında (3001-1571, Thermo) 562 nm'lik absorbans değerinde ölçüm alındı, Excell programında çizilen standart grafiğinden elde edilen denklemle protein miktarları belirlendi.

4.5.3. SDS Jel Elektrophorezi

Protein Jel Elektrophorezi için %10'luk mini protean hazır jel (456-9033, Biorad) veya %10'luk Bis-Tris Bolt hazır jel (NW00100BOX, Thermo) kullanıldı. Kullanılan markaya uyumlu dikey elektrophorez sistemine yerleştirilen jel üzerine 1X yürütme tamponu (Biorad için 10X hazır tampon (161-0732, Biorad), Thermo için 20X Bolt MES hazır tampon (B0002, Thermo)) ile yeterli miktarda dolduruldu. Örneklerin yüklenmeleri amaca göre farklı gerçekleştirildi. Biorad jeller kullanılırken 30 µg veya 50 µg protein örnekleri 4X yükleme tamponu (%10 β-merkaptoetanol içeren) ile karıştırıldı ve dH₂O ile istenen hacme tamamlandı; hazırlanan örnekler 95°C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra marker ile jele yüklendi. Thermo jel kullanırken örnekler 4X Bolt LDS örnek tamponu (B0007, Thermo) ve 10X Bolt örnek denatürasyon tamponu (B0009, Thermo) ile karıştırıldı; hazırlanan örnekler 70°C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra marker ile jele yüklendi. Yükleme işlemi tamamlanan jeller 90 V'da 5 dakika, 100 V'da 1,5 saat yürütüldü.

4.5.4. Proteinlerin Jelden Membrana Transferi

Proteinleri Biorad jelden membrana transfer etmek için nitroselüloz membran (1620112, Biorad) kullanıldı ve transblot cihazında (170-4155, Biorad) 25 V'da 22 dakika süreyle transfer gerçekleştirildi. Proteinleri Thermo jelden membrana transfer etmek içinse PVDF membran (1620177, Biorad) kullanıldı ve mini jel tank içinde (A25977, Thermo) 1X Bolt Transfer tamponu (BT006, Thermo) ile 20 V'da 60 dakika süreyle ıslak transfer gerçekleştirildi.

4.5.5. Antikor Uygulaması

Transfer sonrası membran 1-2 dakika kadar yaklaşık 5 ml TBS-T (1/1000 oranında Tween-20 (P9416-100ML, Sigma-Aldrich) içeren TBS (1706435, Biorad)) solüsyonu ile yıkandı ve TBS-T ile hazırlanan %5'lik BSA (A2153-50G, Sigma-Aldrich) çözeltisinde 1 saat inkübe edildi. Ardından %5'lik BSA solüsyonu ile hazırlanan primer antikor solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat ya da gece boyu +4°C'de rotorda inkübasyona bırakıldı. Membran oda ısısında 3 kez TBS-T solüsyonu

ile 10'ar dakika yıkandı ve %5'lik BSA ile sulandırılan sekonder antikordan eklenip, oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Tekrar 3 kez 10'ar dakika TBS-T solüsyonu ile yıkanan membranın kemiluminisan solüsyonu ile görüntüsü alındı.

Tablo 4.2: Western Blot analizinde kullanılan antikor sulandırma oranları.

	Hedef	Sulandırma Oranı
Primer	Fare anti-insan Myc	1:1000
	Tavşan anti-insan Myc	1:1000
	Fare anti-insan DEK	1:1000
	Tavşan anti-insan DEK	1:1000
	Fare anti-insan IL6	1:1000
	Tavşan anti-insan GAPDH	1:3000
Sekonder	Anti-fare-HRP	1:3000
	Anti-tavşan-HRP	1:3000 veya 1:5000

4.5.6. Görüntüleme

Kemiluminisan görüntülemeye kullanılmak üzere 1 ml ECL solüsyonu ((32132, ThermoScientific) veya (K-12045-D50, Advansta)) hazırlandı ve solüsyon membran üzerine bütün alanı kaplayacak şekilde damla damla dağıtıldı. Ardından görüntüleme cihazı (ChemiDoc XRS+, 721BR04545, Biorad) ve Image Lab. 4.0.1 programı kullanılarak görüntü alındı.

4.6. Proliferasyon Analizi

U937-GFP, U937-MD1 ve U937-MD2 hücreleri 6 kuyulu plakalara 1×10^5 canlı hücre/ml olacak şekilde RPMI 1640 büyüme medyumunda 6 gün için ayrı ayrı ekildi. Her gün aynı saatte hücreler toplandı ve trypan mavisi ile boyandı. Her 24 saat için canlı hücre sayısı verilerinden grafik oluşturuldu.

Hs27A-GFP, Hs27A-MD1, Hs27A-MD2 hücreleri 6 kuyulu plakalara 2×10^5 canlı hücre/ml olacak şekilde RPMI 1640 medyumunda 6 gün için ayrı ayrı ekildi. Her gün aynı saatte hücreler sayılmak için üzerindeki besiyeri, hücrelerin yıkandığı PBS ve tripsin ile muamele edilip toplanan hücreler kuyu başına tek bir falkonda toplandı. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlenen hücrelerin üzerinden 8 ml süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti kalan 2 ml süpernatant içinde çözülüp Trypan mavisi ile sayıldı. Her 24 saat canlı hücre sayısı verilerinden Prism 8 programında hücre büyüme grafikleri oluşturuldu. Two-way ANOVA testi ile istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olup olmadığı analiz edildi.

4.7. U937 Hücrelerinin Makrofaja Farklılaştırılması

Liyofilize olarak satın alınan forbol 12-miristat 13-asetat (PMA; P1585-1MG, Sigma) 1mM stok olacak şekilde DMSO içinde çözülerek hazırlandı ve kullanılacak miktarın konsantrasyonu 100 ng/μl olarak ayarlandı, alikotlandı ve ışıktan korunarak -20°C'de muhafaza edildi. PMA kullanılmadan hemen önce 20°C'den çıkarılarak kullanıldı.

U937-GFP, U937-MD1 ve U937-MD2 hücreleri toplandı ve sayıldıktan sonra her hücre hattı için 5×10^5 hücre/ml olacak şekilde serumsuz RPMI 1640 besiyerinde (%1 P/S) çözülüp içine 100 ng/ml PMA (162 nM) eklendi. Planlanan deneye göre 6 kuyucuklu plaka veya T75 flask içine hazırlanan hücrelerin ekimi gerçekleştirildi. Ekimi yapılan hücreler ışıktan korunarak %5 CO₂ ve 37°C inkübatörde 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücrelerdeki morfolojik değişimler ışık mikroskobu ile görüntülendi ve immünfloresan (IF) boyama veya kültür edilmiş hücre medyumunda DEK1/DEK2 varlığının Western blot analizi deneylerinde kullanıldı.

4.8. Hücre Medyumunda Protein Ekspresyonunun Araştırılması

4.8.1. Hücre Medyumunun Toplanması

Kültürde büyütülen ve bölünme evresindeki sağlıklı U937-GFP, U937-MD1 ve U937-MD2 hücreleri toplanarak sayıldı. Daha sonra, pelletler 3 kez PBS ile süspanse edilip 1200 rpm'de 4 dakika santrifüjlenerek yıkama yapıldı. Her hücre hattı pelleti 5×10^5 hücre/ml olacak şekilde serumsuz RPMI 1640 besiyeri ile süspanse edildi. 4 ml medyum konsantrasyonu için T25 flaska, 15 ml medyum konsantrasyonu için T75 flasklara ekim yapıldı. Serumsuz besiyeri eklendiğinde ve besiyeri değişimi gerçekleşikten 18 saat sonra hücre canlılığı kontrolü için flasklar ışık mikroskobu ile fotoğraflandı. T25 flasklardan 4 ml besiyeri falkona toplanırken, T75 flasklardan 15 ml besiyeri falkona toplandı ve 1500 rpm'de 7 dakika santrifüjlendi. 4 ml olarak santrifüjlenen medyumu konsantre etmek için hücre pelletine dokunmadan pipetman ile yaklaşık 4 ml medyum yavaşça 10 kDa ve üzeri proteinleri tutma kapasitesine sahip Amicon Ultra-4 filtre (UFC801024, Millipore) üzerine alındı ve proteaz inhibitörü (11873580001, Sigma) eklendi. Amicon Ultra-4 filtreler santrifüj cihazı (ScanSpeed 1580R) ile 3600 xg'de (RCF) +4°C'de 45 dakika boyunca santrifüjlendi. Filtre üzerinde kalan 60 µl konsantre medyum iki tüpe bölündü ve bir tüp direk deney için kullanılırken diğeri daha sonra kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı.

15 ml olarak santrifüjlenen medyumu konsantre etmek için hücre pelletine dokunmadan pipetman ile yaklaşık 15 ml medyum yavaşça 10 kDa ve üzeri proteinleri tutma kapasitesine sahip Amicon Ultra-15 filtre (UFC901024, Millipore) üzerine alındı ve proteaz inhibitörü eklendi. Amicon Ultra-15 filtreler santrifüj cihazı (ScanSpeed 1580R) ile 3600 xg'de (RCF) +4°C'de 45 dakika boyunca santrifüjlendi. Filtre üzerinde kalan 200 µl konsantre medyuma 2 ml PBS eklendi ve solüsyon Amicon Ultra-4 filtreye konulup aynı santrifüj cihazında tekrar konsantre edildi. Konsantre medyum (60 µl) filtreden toplandı. Aynı işlem hücrelerin serumsuz besiyeriyle flaska ekimi esnasında hücrelere 10 ng/ml rekombinant IL-8 (208-IL-010/CF, RD) uygulanarak da gerçekleştirildi. PMA ile farklılaşan hücrelerden besiyeri toplayabilmek için 72 saat farklılaşma sonrasında besiyeri hücrelerin üzerinden uzaklaştırılıp 3 kez PBS ile yıkama yapıldı ve serumsuz besiyerinden 7,5 ml flasklara eklenip inkübatöre (%5 CO₂, 37°C) kaldırıldı, 18 saat inkübasyonun ardından aynı

şekilde medyum konsantre edildi. Final miktarı 60 µl olan örnekler iki tüpe bölündü daha sonra kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı.

Bazı deneylerde, konsantre medyumlar 4X LB (%10 β-merkaptotanol içeren) ile karıştırıldı. Hazırlanan örnekler 70°C'de 10 dakika inkübe edildi ve ikiye bölünüp daha sonra kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı. Örnekler ELISA deneyi için kullanılacaksa denatüre edilmedi.

Hs27A-GFP, Hs27A-MD1 ve Hs27A-MD2 hücreleri toplanıp sayıldıktan sonra her hücre hattı için 2xT75 flaska 1,5x10⁶ hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 48. saatte hücrelerin üzerindeki eski besiyeri uzaklaştırıldı. Hücreler PBS ile 3 kez yıkandı ve serumsuz besiyerinden 7,5 ml flasklara eklenip inkübatöre (%5 CO₂, 37°C) kaldırıldı. Başka bir grup hücreye serumsuz besiyeriyle beraber 10 ng/ml rekombinant IL-8 (208-IL-010/CF, RD) uygulandı. Hücrelere serumsuz besiyeri eklendi ve 18 saat sonrasında canlılıkları ışık mikroskopta incelendi ve fotoğraflandı. Besiyeri değişimi gerçekleştikten 18 saat sonra 2xT75 flasktan yaklaşık 15 ml medyum falkona toplanıp 1500 rpm'de 7 dakika santrifüjlendi. Santrifüjlenen medyum yukarıda anlatıldığı şekilde konsantre edildi ve elde edilen 60 µl örnek filtreden toplandı ve iki tüpe bölünerek daha sonra kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı.

Hs27A-GFP, Hs27A-MD1 ve Hs27A-MD2 hücrelerinden 4 ml medyum konsantrasyonu için 2xT25 flaska 5x10⁵ hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 48. saatte eski besiyeri uzaklaştırıldı. Hücreler PBS ile 3 kez yıkandı ve serumsuz besiyerinden 2,2 ml flasklara eklenip inkübatöre kaldırıldı. On sekiz saat sonrasında yukarıda anlatıldığı şekilde Amicon Ultra-4 filtre ile medyum konsantrasyonu gerçekleştirildi.

4.8.2. Medyumda DEK1 ve DEK2 Varlığının Western Blot Yöntemiyle Analizi

Konsantre medyum örnekleri -80°C'den çıkarıldıktan sonra 4X yükleme tamponu (%10 β-merkaptotanol içeren) ile karıştırıldı ve 70°C'de 10 dakika inkübe edildi; Thermo jel kullanırken örnekler 4X Bolt LDS örnek tamponu (B0007, Thermo) ve 10X Bolt örnek denatürasyon tamponu (B0009, Thermo) ile karıştırıldı. Örnekler jele yüklendikten sonra, bölüm 4.5'te anlatıldığı şekilde, SDS jel elektroforezi, antikor uygulaması ve görüntüleme gerçekleştirildi.

4.8.3. ELISA Yöntemi

Sandwich ELISA yönteminin uygulanabilmesi için 96 kuyulu immün plaka (M9410-1CS, SigmaAldrich) kullanıldı. Boş plakaya hedef peptid/proteini yakalayacak olan 5 µg/ml Myc (Myc-Tag (71D10) Rabbit mAb #2278) antikoru kaplama tamponu ile 4°C’de gece boyu kaplandı. Ertesi sabah plaka 3 defa PBS-T (%0.05 Tween) ile yıkandı. Her kuyuya 300 µl bloklama solüsyonundan (%2 BSA in PBS-T) konuldu ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Plaka 2 defa PBS-T ile yıkandı. Hs27A-GFP, Hs27A-MD1 ve Hs27A-MD2 lizat (20 µg) ve medyum (40 µg, 80 µg veya 100 µg) örnekleri bloklama solüsyonu içinde ayarlandı ve 100 µl olarak kuyulara dağıtıldı. Plaka oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Plaka 3 defa PBS-T ile yıkandı. Myc antikoru ile yakalanan DEK proteinlerini tespit etmek için 0.5 µg/ml oranında DEK (BD DEK Anti-Human Mouse mAb #610948) antikoru kuyu başına 100 µl olacak şekilde dağıtıldı ve oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Plaka 3 defa PBS-T ile yıkandı. Alkalın fosfatazlı Anti-mouse sekonder 1:1000 oranında bloklama solüsyonu içinde sulandırıldı ve 100 µl olarak hedef kuyulara dağıtılıp oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edildi. Plaka 3 defa PBS-T ile yıkandı. Görüntüleme için 1 substrat tableti (S0942, Sigma) 5 ml 1X substrat buffer içinde vortexleyerek çözüldü. Substrat ışıktan etkilendiği için falkon alüminyum folyo ile kaplandı. Hedef kuyulara 100 µl substrat dağıtıldı ve 15-20 dakika karanlıkta yapılan inkübasyon sonunda Multiscan FC cihazında (357-701180, Thermo Scientific) 405 nm dalga boyunda ölçüm alındı.

İndirekt ELISA yönteminde Sandwich ELISA yönteminden farklı olarak boş plakaya ilgili antikor (Myc) bağlanmadı. Hücre lizat ve medyumları kaplama tamponu ile kuyulara dağıtılıp 4°C’de inkübe edilerek gece boyu bağlanması sağlandı. Plaka kaplandıktan sonra 2 defa yıkama yapıldı. Her kuyuya 300 µl bloklama solüsyonu konuldu ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. 0.5 µg/ml oranında primer antikor kuyulara dağıtıldı ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Plaka 3 defa yıkandı. Alkalın fosfatazlı anti-fare veya anti-tavşan sekonder antikoru 1:1000 oranında bloklama solüsyonu içinde sulandırıldı ve 100 µl olarak hedef kuyulara dağıtılıp yukarıda anlatıldığı gibi devam edildi, ölçüm alındı.

4.9. İmmünfloresan Boyama ve Konfokal Hücre Görüntülemesi

U937 monosit hücre hatlarının (GFP, MD1 ve MD2'nin) makrofaja farklılaşması PMA ile bölüm 4.7'de anlatıldığı gibi lamel konulan 6 kuyulu plakalarda gerçekleştirildi. U937 hücreleri hücrelerinin süspanse olmasından dolayı lameller önce Poly-L-Lizin (#P5899-5MG, Merck) ile kaplandıktan sonra U937 hücrelerinin kuyulara tutunmaları sağlandı. Daha sonra hücreler üzerindeki medyum uzaklaştırıldı, 3 kez 500 µl PBS ile yıkama (ilk yıkama hızlı diğerleri 5'er dakika çalkalayıcıda) yapıldı. Hücreleri sabitlemek amacıyla 500 µl %4 paraformaldehid (PFA) oda sıcaklığında 20 dakika uygulandı. 3 kez 500 µl PBS ile yıkama (çok yavaş ve hassas şekilde yıkama) yapıldı. Hücrelerin geçirgen hale gelmesi için %0.5 Triton X-100 içeren 500 µl PBS (10ml PBS + 50 µl Triton-X) ile oda sıcaklığında 20 dakika çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. 2 kez 500 µl PBS ile yıkama (çok yavaş ve hassas şekilde yıkama) yapıldı. Örneklerin 500 µl %2 BSA içeren PBS (0.2 gr BSA + 10 ml 1X PBS) ile oda sıcaklığında ve 1 saat inkübe edilerek bloklanması sağlandı. Anti-Myc (2278S, CST) primer antikoru (1:400) içeren 500 µl %1'lik BSA solüsyonu ile nemlendirilmiş kutu içinde gece boyu +4°C'de inkübe edildi. Ertesi gün solüsyon uzaklaştırıldı ve örnekler 3 kez %1'lik BSA solüsyonu ile yıkama (yavaşça yıkama) yapıldı. Sekonder antikoru uygulama ve sonraki adımlarda alüminyum folyo kullanılarak karanlık ortam sağlandı. Anti-rabbit Alexa Flour 555 (kırmızı floresan, 4413S, CST) sekonder antikoru (1:500) içeren 500 µl %1'lik BSA solüsyonu ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Sekonder antikor solüsyonu uzaklaştırıldı ve örnekler MilliQ distile su ile 3-4 kez çalkalayıcı kullanmadan yıkandı. Lamel soğuk hava ile iyice kurutulduktan sonra DAPI içeren Vectashield Mounting Medyum'dan (H-1200, Vector Lab.) 10 µl damlatıldı ve lam ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatıldı. Lamelin kenarları tırnak cılası sürülerek kurumaya bırakıldı. Hazırlanan lamalar +4°C karanlıkta saklanıp Zeiss LSM 880 Airyscan Konfokal Mikroskop ile görüntülenip fotoğraflandı.

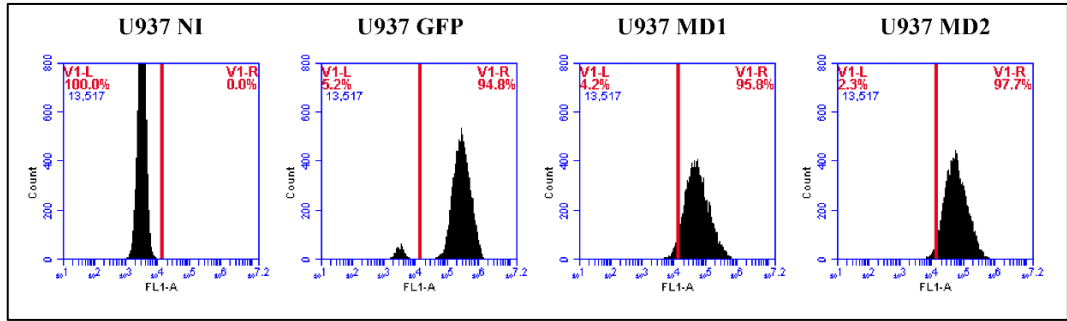
4.10. İstatistiksel Analiz

Deneylerden elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri GraphPad Prism 8 programında yapıldı. İstatistiksel anlamlılıkları belirlemek için “Two-way ANOVA” testi kullanıldı. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

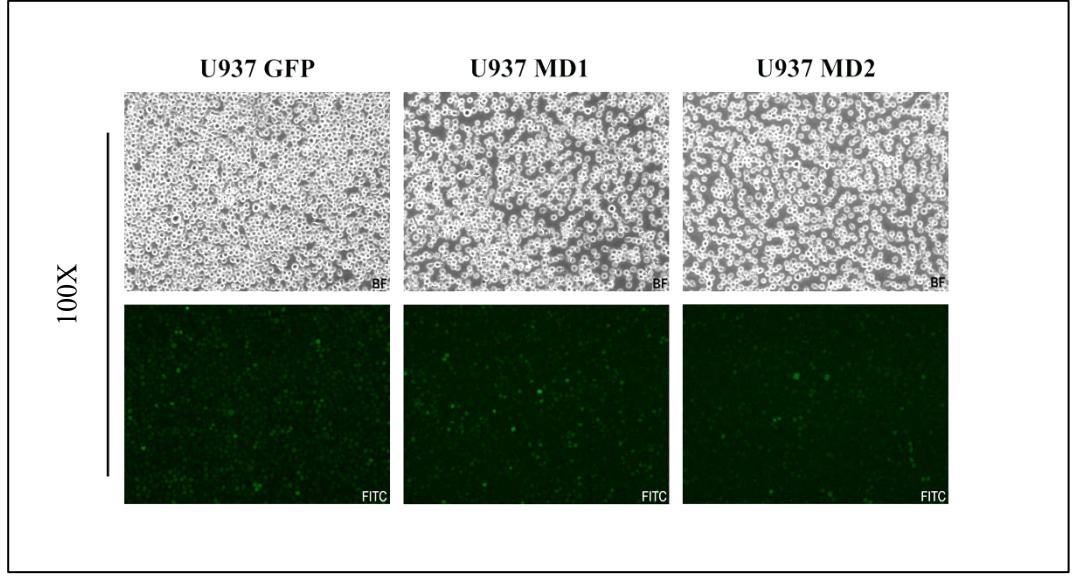
5.1. MycDEK1 veya MycDEK2'yi Kalıcı Olarak Aşırı İfade Eden U937 ve Hs27A Hücrelerinin Oluşturulması

Önerilen tez çalışmasında DEK1 ve DEK2 ifadesindeki artışın monosit ve kemik iliği stroma hücrelerinin biyolojik özelliklerine etkisini araştırmak amacıyla, her iki proteinin de (ayrı ayrı retroviral vektörlerle oluşturulan viral transdüksiyonla) U937 ve Hs27A hücrelerinde kalıcı olarak ifade edilmesi sağlandı. Kullanılan retroviral vektörlerdeki (“murine stem cell virus” (MSCV-IRES-GFP)) “internal ribosome entry site (IRES)” varlığı sayesinde, transdükte olan hücreler, N-ter bölgesine Myc epitopu (amino asit dizisi; N-EQKLISEEDL-C) eklenmiş olan DEK1 veya DEK2'ye ilave olarak ayrıca GFP protein ifadesine de sahip oldular. Transdüksiyonu takip eden süreçte hücreler kültür ortamında çoğaltılarak GFP⁺ hücre oranları belirlendi. FACS cihazı ile birkaç tekrarlı hücre ayrıştırmadan sonra çok düşük seviyedeki GFP⁺ hücre oranı yüksek GFP⁺ seviyeye çıkarıldı ve bu ayrıştırmalar sonrasında U937-GFP %94; U937-MD1 %95; U937-MD2 %97 oranında GFP⁺ hücreye sahipti (Şekil 5.1).



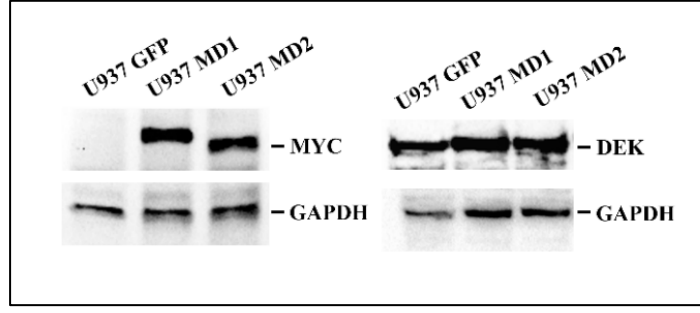
Şekil 5.1: Retroviral transdüksiyon ardından FACS ile ayrıştırılan U937 hücre hattında aşırı DEK1/DEK2 ifadesinin Accuri C6 Flow Sitometri Analizi. U937 NI: Transdükte edilmemiş olan ve negatif kontrol olarak kullanılan parental hücreler.

Analiz sonucuna göre FACS ile ayrıştırılan hücrelerin %94'in üzerinde olan GFP⁺ oranı ışık mikroskop ve ters floresan mikroskop altında yapılan incelemeler aracılığıyla da gösterildi (Şekil 5.2).



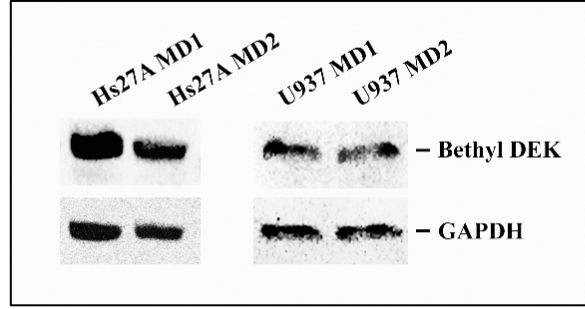
Şekil 5.2: FACS ile ayırıştırılan U937 hücre hatlarının inverted mikroskop görüntüleri.

FACS ile ayırıştırılan hücrelerden izole edilen total protein ile Western blot analizi yapıldı. Yapılan Western blot analizinde yükleme kontrolü olarak GAPDH proteini kullanıldı ve bantların kendi içinde tutarlı olduğu Şekil 5.3 sol bölümde gözlemlendi. Şekil 5.3 sağ bölümde U937-MD1 ve U937-MD2 GAPDH proteinleri benzer yoğunlukta bulunurken U937-GFP GAPDH proteini diğerlerine kıyasla daha azdı ancak DEK proteinlerinin aşırı ekspresyonu Myc antikoru ile bu şekilde teyit edilebildi (Şekil 5.3). DEK1 proteininin 19-169 aminoasitlerine (610948, BD) özgü ve 325-375 aminoasitlerine özgü (A301-335A, Bethyl Laboratories) olarak geliştirilmiş iki ayrı ticari DEK antikoru kullanılarak yapılan Western blot deneylerinde, her iki antikorun da sadece DEK1 izoformuna spesifik olduğu ve hem endojen (U937-GFP hücrelerinde) hem de ektopik DEK1 ekspresyonunu tespit ettiği ancak DEK2 izoformunu tanımadığı gerek Hs27A gerekse U937 hücre hatlarında gösterildi (Şekil 5.4). Bu bulgular üzerine, MycDEK1 ve MycDEK2 içeren ve bu hücre hatlarını oluşturmak için kullanılan retroviral vektörler tekrar dizilendi ve her iki cDNA'nın dizilerinin doğru olduğu teyit edildi.



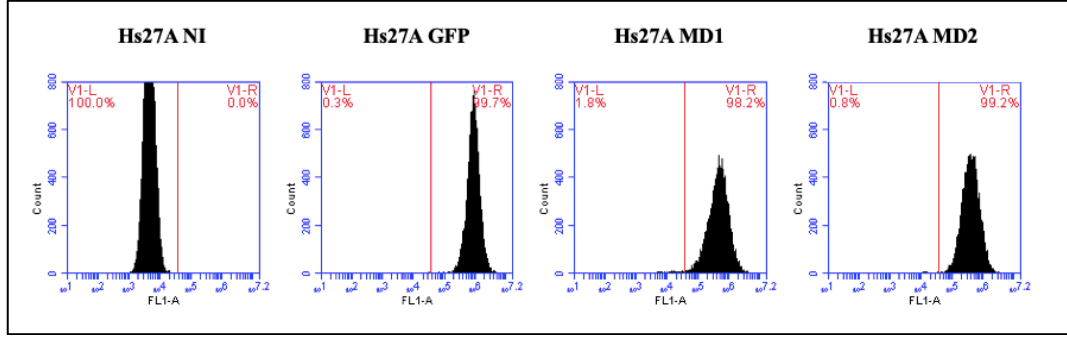
Şekil 5.3: FACS ile ayırıştırılan U937 hücre hattında aşırı DEK ifadesinin BD-DEK antikoruna ve Myc antikoruna kullanılarak yapılan Western blot analizi.

Bu deneyler sonucunda, MycDEK1 ve MycDEK2 protein izoformlarının aşırı ifadesi U937 hücre hattında yüksek oranlarda kalıcı olarak sağlanıp U937-MD1, U937-MD2 ve kontrol U937-GFP hücre hatları elde edildi.

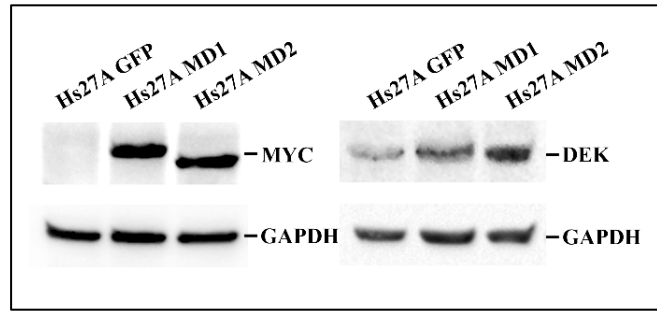


Şekil 5.4: Aşırı DEK ifadesinin Hs27A ve U937 hücre hatlarında Western blot yöntemiyle Bethyl DEK antikoruna kullanılarak incelenmesi.

MSCV-IRES-GFP retroviral memeli ekspresyon vektörüne Myc epitopuna eklenen DEK1 ve DEK2 izoformlarının aşırı ifadesi daha önce laboratuvarımızda yapılan çalışma ile Hs27A hücrelerinde sağlanmıştı. Accuri C6 cihazında yapılan analizde görüldüğü üzere Hs27A-GFP %99; Hs27A-MD1 %98; Hs27A-MD2 %99 oranında GFP⁺ hücreye sahipti (Şekil 5.5). Bu tez çalışmasındaki deneylerde kullanılmadan önce, bu hücrelerdeki MycDEK1 ve MycDEK2 varlığı Western Blot analizi ile teyit edildi (Şekil 5.6). Yükleme kontrolü olarak daha önce de gösterildiği üzere GAPDH proteini kullanıldı ve bant yoğunluklarının eşit seviyede olduğu görüldü (Şekil 5.6).



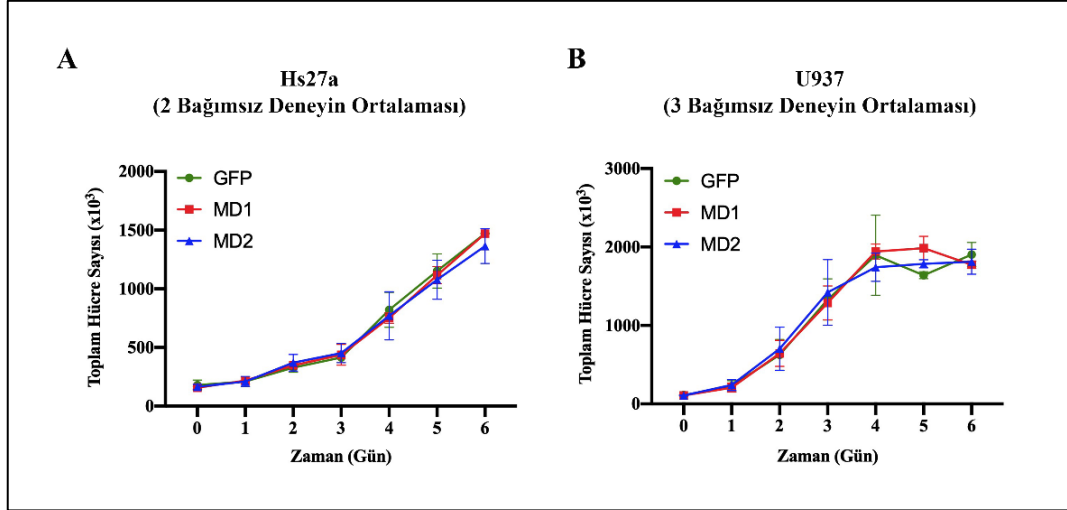
Şekil 5.5: Hs27A hücre hattında aşırı DEK1/DEK2 ifadesinin Accuri C6 Flow Sitometri Analizi. Hs27A NI: Transdükte edilmemiş olan ve negatif kontrol olarak kullanılan parental hücreler.



Şekil 5.6: Hs27A hücre hattında aşırı MycDEK1 ve MycDEK2 ifadesinin Myc ve BD DEK antikorları kullanılarak Western blot analizinde doğrulanması.

5.2. MycDEK1 veya MycDEK2 ifadesi arttırılmış U937 ve Hs27A Hücrelerinde Proliferasyon Analizleri

DEK1 ve DEK2 protein izoformlarının aşırı ifadesi U937 ve Hs27A hücrelerinde doğrulandıktan sonra bu hücrelerin çoğalma hızlarının incelenmesi amacıyla periyodik çoğalma analizi gerçekleştirildi ve 0. günde aynı sayıda ekilen hücreler, 24 saat arayla ardışık olarak (1-6.günler arasında) her gün kültür kabından alındı ve trypan mavisi ile boyanarak canlı ve ölü hücreler sayıldı. Bu analiz sonucunda MycDEK1 ve MycDEK2 ifadesi olan U937 ve Hs27A hücrelerinin GFP-kontrol hücrelerine kıyasla çoğalmalarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edildi (Şekil 5.7). Her iki hücre hattında da 1-6 günler arasında hücre canlılık oranı %90'ın üzerindiydi.

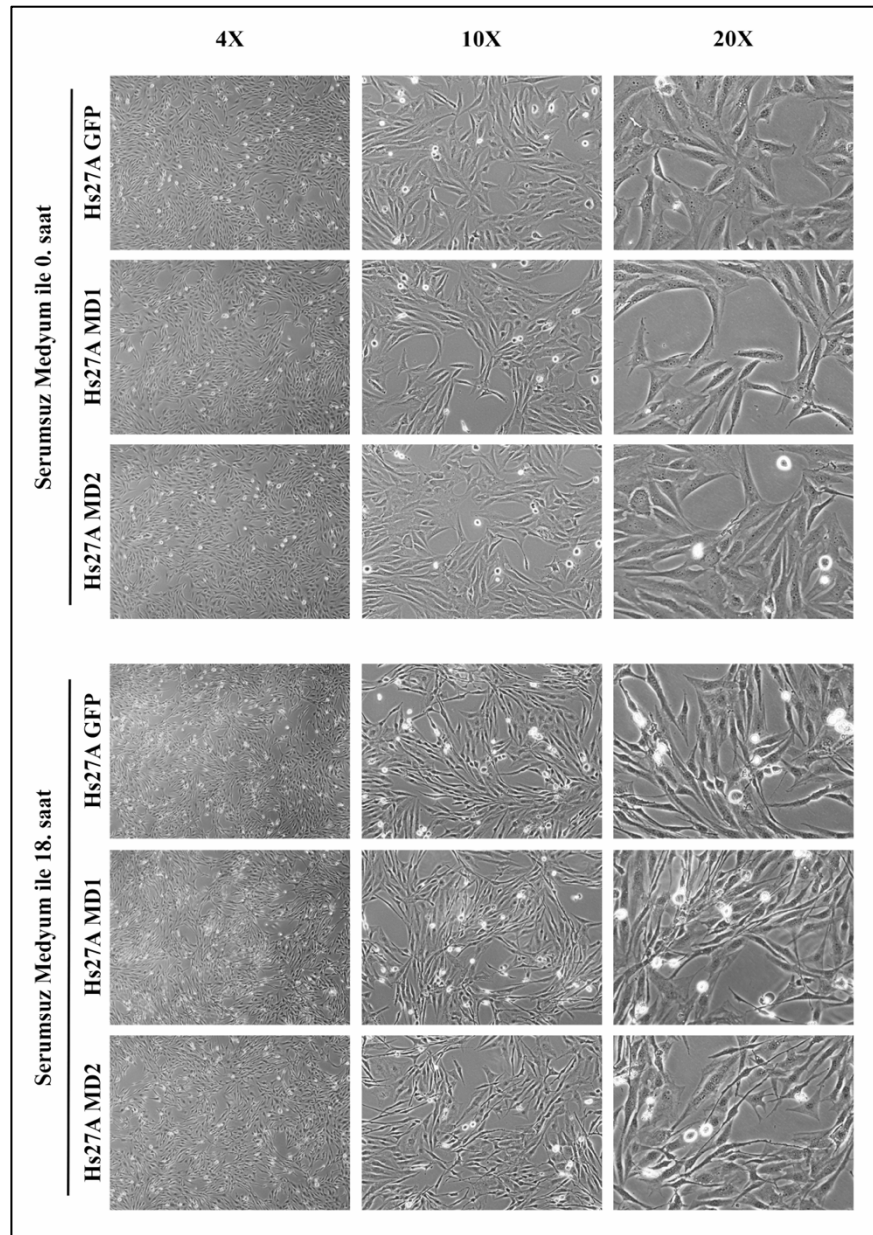


Şekil 5.7: Aşırı DEK ekspresyonunun Hs27A (A) ve U937 (B) hücrelerinin büyümeleri üzerindeki etkisi (Two-way ANOVA, ns; istatistiksel olarak anlamsız).

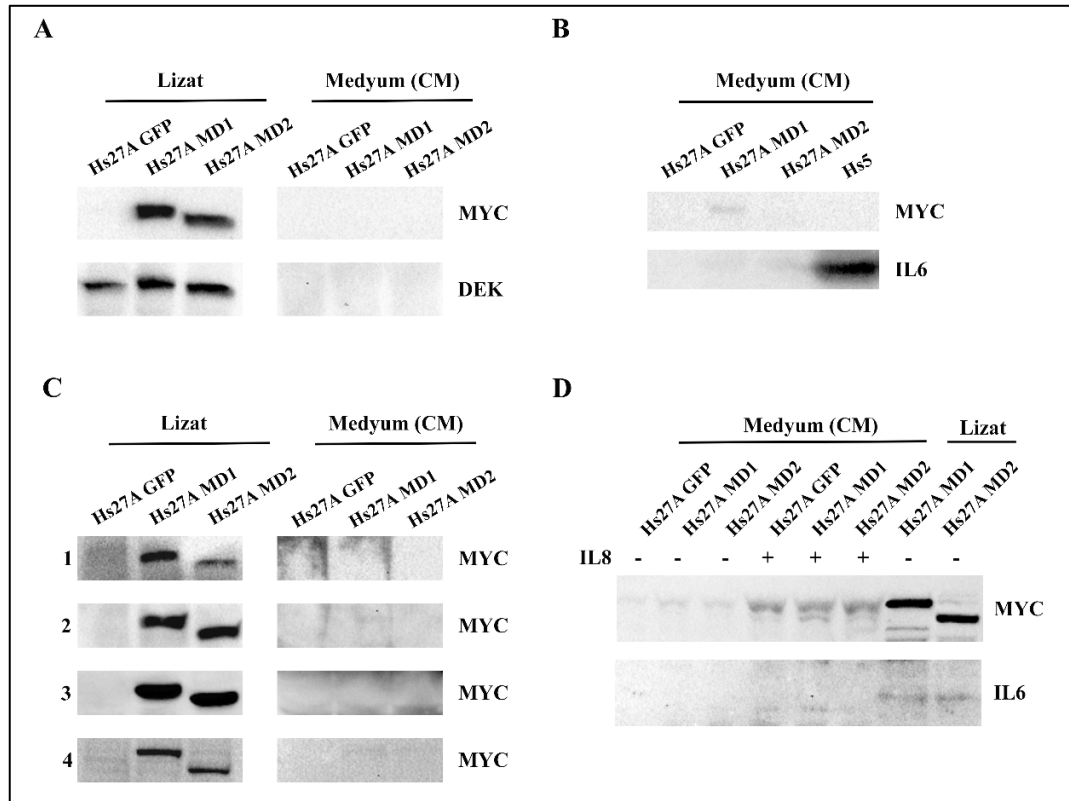
5.3. Hs27A Hücre Hattında MycDEK1 ve MycDEK2 Proteinlerinin Hücrelerden Salgılanıp Salgılanmadığının Western Blot Yöntemiyle Analiz Edilmesi

DEK1'in aktive olmuş primer insan makrofaj hücrelerinden salgılandığı bilinmektedir [Mor-Vaknin et al., 2006] ancak DEK2'nin de salgılanıp salgılanmadığına dair bizim bilgimiz dahilinde literatür bilgisi mevcut değildir. Bu tez çalışmasında önce gerek DEK1 gerekse DEK2 proteinlerinin Hs27A stroma hücrelerinden de salgılanıp salgılanmadığı test edildi. Bu amaçla, 2xT25 flaska 0.günde 5×10^5 hücre ekildi. Kırk sekiz saat inkübasyonun ardından hücreler 18 saat serum içermeyen besiyeri ile inkübe edildi ve ardından metot kısmında anlatıldığı şekilde toplanan besiyeri konsantre edildi (Conditioned medium (CM)). Bu aşamada, hücrelerin canlılıklarında inverted mikroskop ile tespit edilecek düzeyde azalma olmadığı gözlemlendi (Şekil 5.8). Konsantre edilen besiyeri (CM) ve kontrol amaçlı kullanılan hücre lizatlarında Western Blot yöntemiyle DEK1 ve DEK2 varlığı anti-Myc antikoru kullanılarak test edildi. Elde edilen sonuçlar, hücre lizatlarında MycDEK1/MycDEK2'nin mevcut olduğunu ancak CM'de her iki proteinin de tespit edilebilir düzeyde olmadığını gösterdi (Şekil 5.9-A). Pozitif kontrol olarak HS5 kemik iliği stroma hücre hattı CM'si kullanılarak Hs27A CM'leri tekrar analiz edildiğinde Hs27A hücrelerinde MycDEK1 ve MycDEK2 için yine benzer sonuç alındı, ancak HS5 hücrelerinin yoğun olarak salgıladığı bilinen IL-6'nın varlığı HS5 hücrelerinin CM'sinde tespit edildi (Şekil 5.9-B). Bu sonuçlar, kullanılan metodun çalıştığını

ancak DEK1/DEK2'nin ya salgılanma düzeyinin çok düşük olduğunu ya da bu hücre hattından salgılanmadığını gösterdi. Aynı deney daha fazla sayıda hücre (2xT75 flaska 0. Günde $1,5 \times 10^6$ hücre ekilerek) ve bu hücrelerden 15 ml CM kullanılarak 4 kez tekrar edildi ve benzer sonuçlar alındı (Şekil 5.9-C). Son olarak, benzer deney IL-8 sitokini (10 ng/ml) ile hücreler 18 saat boyunca serumsuz besiyerinde (15 ml) uyarıldıktan sonra konsantre edilen CM kullanılarak tekrarlandı ve sonucun değişmediği, IL-8'in de Hs27A hücrelerinden DEK1/DEK2 salınmasını tespit edilebilir düzeyde uyarmadığını gösterdi (Şekil 5.9-D).



Şekil 5.8: Hs27A hücre hattında medyum konsantrasyonu öncesi hücre canlılıklarının inverted mikroskop ile gösterilmesi.

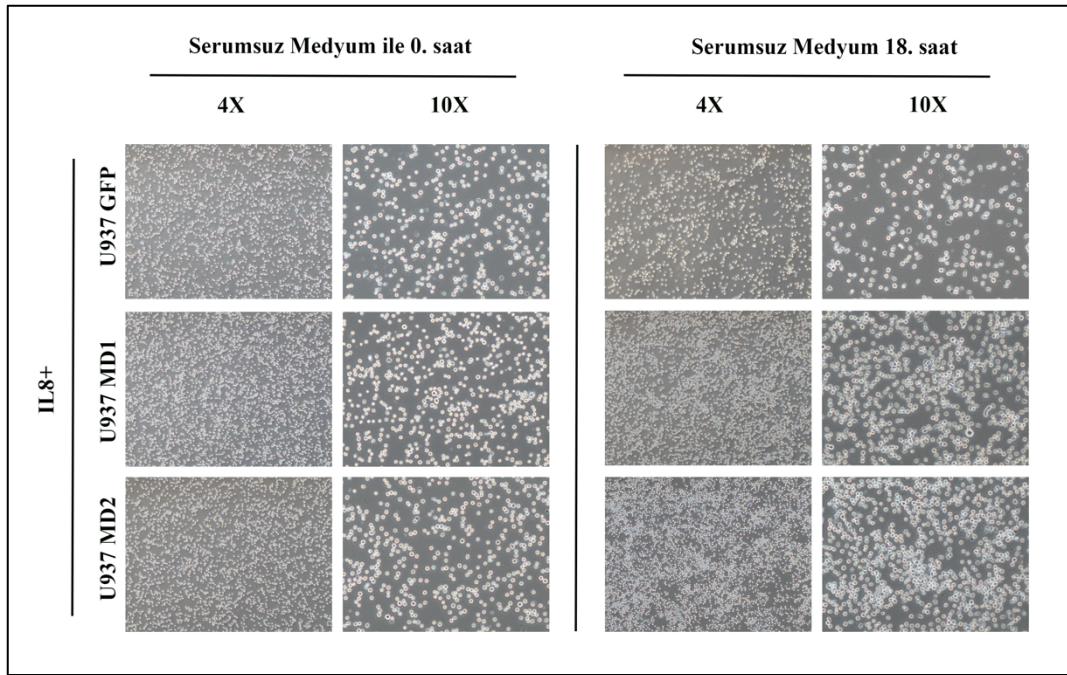


Şekil 5.9: Hs27A hücre hattı medyumunda DEK1 ve DEK2 izoform proteinlerinin Western blot analizi. Lizat: 20 µg total protein; CM: 30 µl konsantre medyum; MYC: anti-Myc antikoru, IL-6: anti-IL6 antikoru.

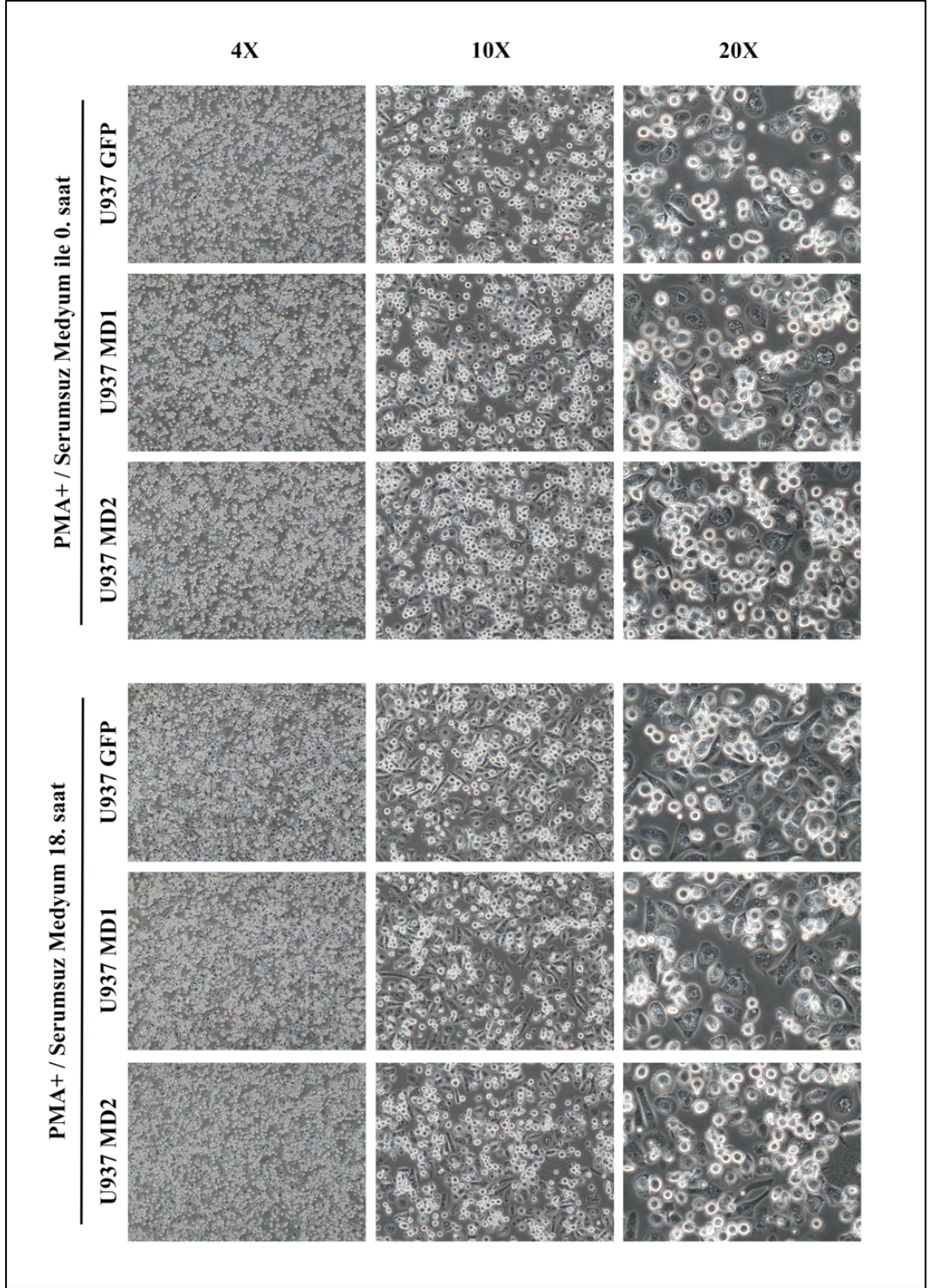
5.4. U937 Hücre Hattında MycDEK1 ve MycDEK2 Proteinlerinin Hücrelerden Salgılanıp Salgılanmadığının Western Blot Yöntemiyle Analiz Edilmesi

Daha önce primer monositlerden türetilen makrofajlarda DEK1 salgılandığı gösterilmiştir [Mor-Vaknin et al., 2006]. U937 hücre hattı monosit olduğundan hücrenin çoğunluğunu hücre çekirdeği kaplar ve sitoplazması diğer hücrelere göre daha azdır [Pagliara et al., 2005]. Monosit/makrofaj hücreleri kemokinler, sitokinler, ve büyüme faktörleri gibi birçok faktörü salgılayabilen hücrelerdir [Yang et al., 2014]. Bu tez çalışmasında DEK protein izoformlarının salgısının tespiti için Hs27A hücrelerine ilave olarak, U937 hücre hatları da kullanıldı ve hücreler toplanıp yıkandıktan sonra 0. saatte 5×10^5 hücre/ml olacak şekilde 4 ml CM için T25 flasklara 15 ml CM için T75 flasklara serumsuz besiyeri ile ekildi. Hücrelerin 18 saat serumsuz besiyerinde tutulma sürelerinin sonunda canlılıkları inverted mikroskop ile incelendi (Şekil 5.10). Konsantre edilen CM örnekleri ve hücre lizatları düşük seviyedeki proteinleri de gösterebilen Western Blot (İnvitrogen Bolt Jel sistemi) yöntemi

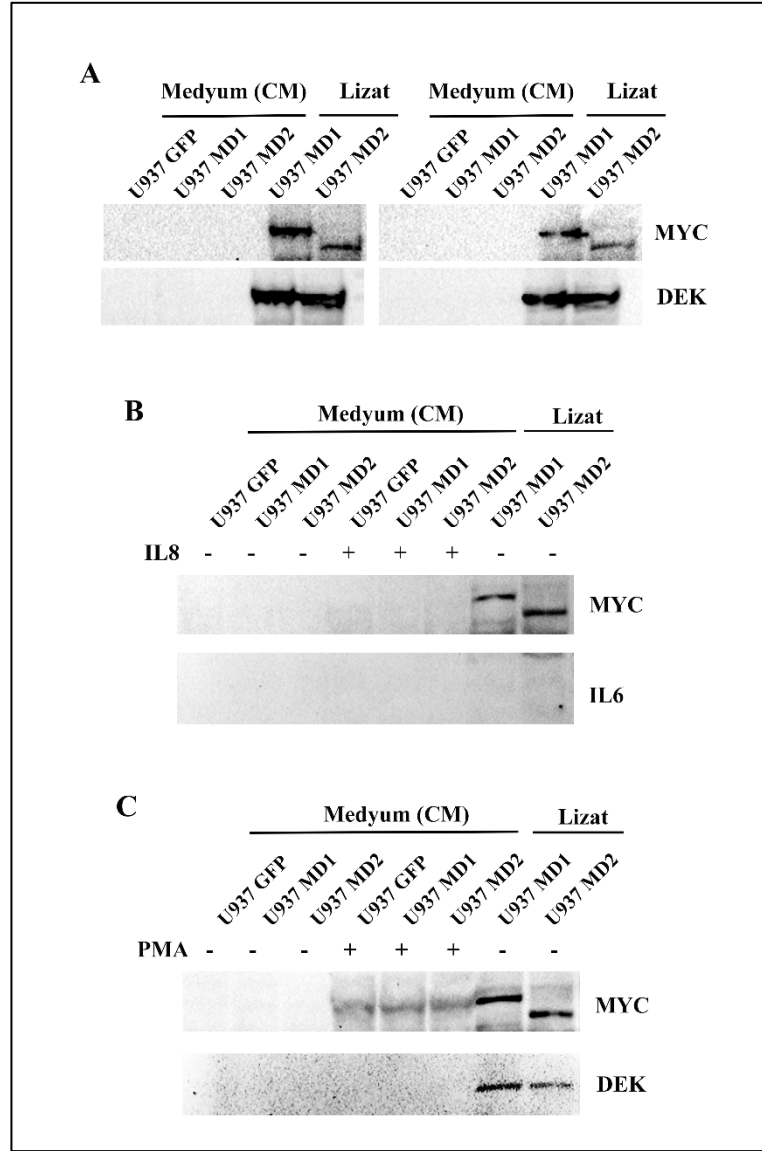
kullanılarak analiz edildi. Elde edilen sonuçlar, DEK1 veya DEK2 proteinlerinin tespit edilebilir düzeyde salgılanmadığını gösterdi (Şekil 5.12-A). Hs27A hücre hattında yapıldığı gibi IL-8 varlığında da 15 ml medyum toplanıp konsantre edildiğinde ve hücre lizatlarıyla beraber analiz edildiğinde aynı sonuçlar elde edildi (Şekil 5.12-B). Bu deneylere ilave olarak, PMA ile 72 saat boyunca makrofaja farklılaştırılan U937 hücrelerinde DEK protein salgısını Western blot analiziyle araştırmak üzere 15 ml CM konsantre edildi. Serumsuz medyum eklendiğinde 0. ve 18. saat esnasında hücre canlılığı inverted mikroskop ile analiz edildi (Şekil 5.10-Şekil 5.11). Western blot analizi sonucunda PMA ile uyarılmanın da DEK izoformlarının tespit edilebilir düzeyde salgılanmasına yol açmadığı belirlendi (Şekil 5.12-C). Özetle, elde edilen sonuçlar Hs27A hücre hattında olduğu gibi U937 hücre hattında da DEK izoformlarının Western blot yöntemiyle tespit edilebilir düzeyde salgılanmadığını gösterdi.



Şekil 5.10: U937 hücre hatlarının IL-8 varlığında CM konsantrasyonu öncesi inverted mikroskop ile alınmış görüntüleri.



Şekil 5.11: PMA ile farklılaştırılan U937 hücre hatlarının CM konsantrasyonu öncesi inverted mikroskopla alınmış görüntüleri.

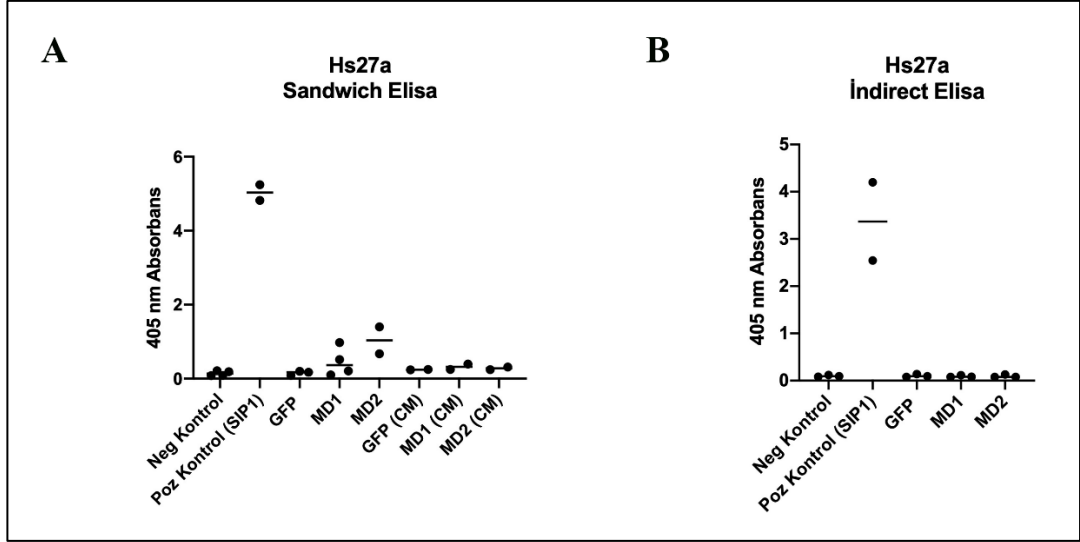


Şekil 5.12: U937 hücre hatlarının lizat ve CM'sinde DEK1 ve DEK2 izoformlarının Western blot analizi. 4 ml (sol) ve 15 ml (sağ) konsantre edilen (A), IL-8 ile muamele edilen (B) ve PMA ile farklılaşan (C) hücrelerden elde edilen proteinler. Lizat: 50 µg total protein; CM: 30 µl konsantre medyum; MYC: anti-Myc antikoru; BD DEK: anti-DEK antikoru.

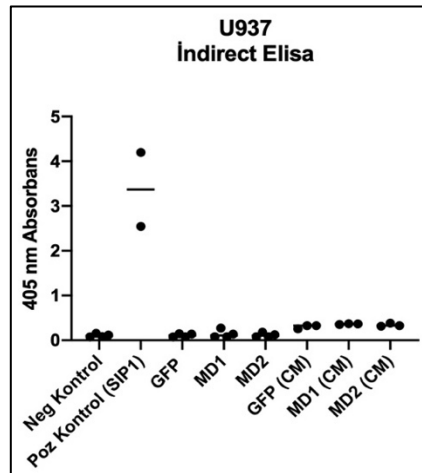
5.5. DEK İzoformlarının Salgısının ELISA Yöntemiyle Araştırılması

Çalışmamızda, HS27A ve U937 hücre hatlarında DEK izoformlarının hücre dışına salgılanıp salgılanmadığı ELISA yöntemiyle de araştırıldı. Bu amaçla, U937 ve Hs27A hücrelerinin CM'si ve bu hücrelerin lizatlarından elde edilen total protein, metot kısmında anlatıldığı şekilde iki ayrı ELISA yöntemi kullanılarak MycDEK1 ve MycDEK2 proteinlerinin varlığı anti-Myc antikoru kullanılarak test edildi. Hs27A

hücre lizatlarında kontrol GFP hücrelerine kıyasla DEK1 ve DEK2'nin bulunduğu ancak CM'ler karşılaştırıldığında GFP-kontrol hücreleriyle MD1 ve MD2 hücreleri arasında fark olmadığı tespit edildi (Şekil 5.13). U937 hücrelerindeyse gerek lizatlarda gerekse CM'lerde MD1 ve MD2 varlığı tespit edilemedi (Şekil 5.14).



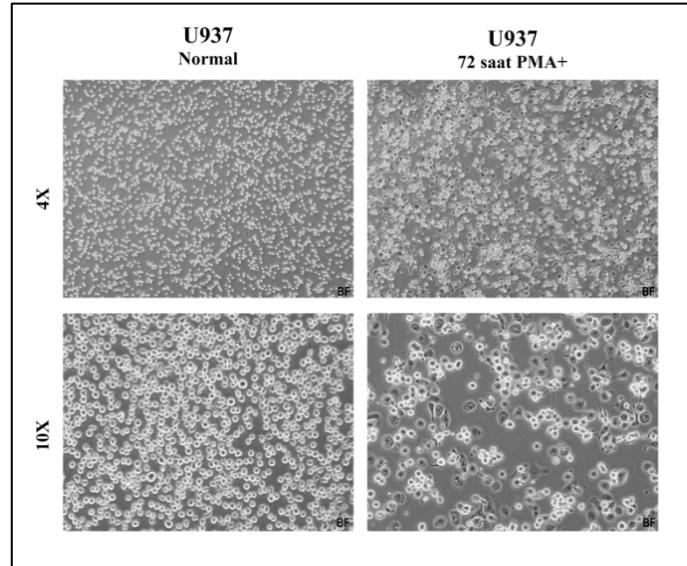
Şekil 5.13: Hs27A hücre hattı total proteinleri (GFP, MD1, MD2) ve CM örneklerinin ELISA yöntemiyle incelenmesi. Rekombinant insan SIP1 proteini ELISA deneyinin pozitif kontrolü olarak kullanılmıştır. Grafiklerdeki her yuvarlak, aynı deneydeki ikili tekrarı göstermektedir. A'da, iki kuyucuklu tekrar olarak çalışılan iki ayrı ELISA deneyinin sonuçları gösterilmekte ve total protein örnekleri (Neg, GFP ve MD1) iki ELISA deneyinde de kullanıldığı için 4 yuvarlak olarak gösterilmiştir. B'de sadece total protein örnekleri kullanılmıştır, yuvarlaklar bir deneyin 3 kuyucuklu tekrarını göstermektedir.



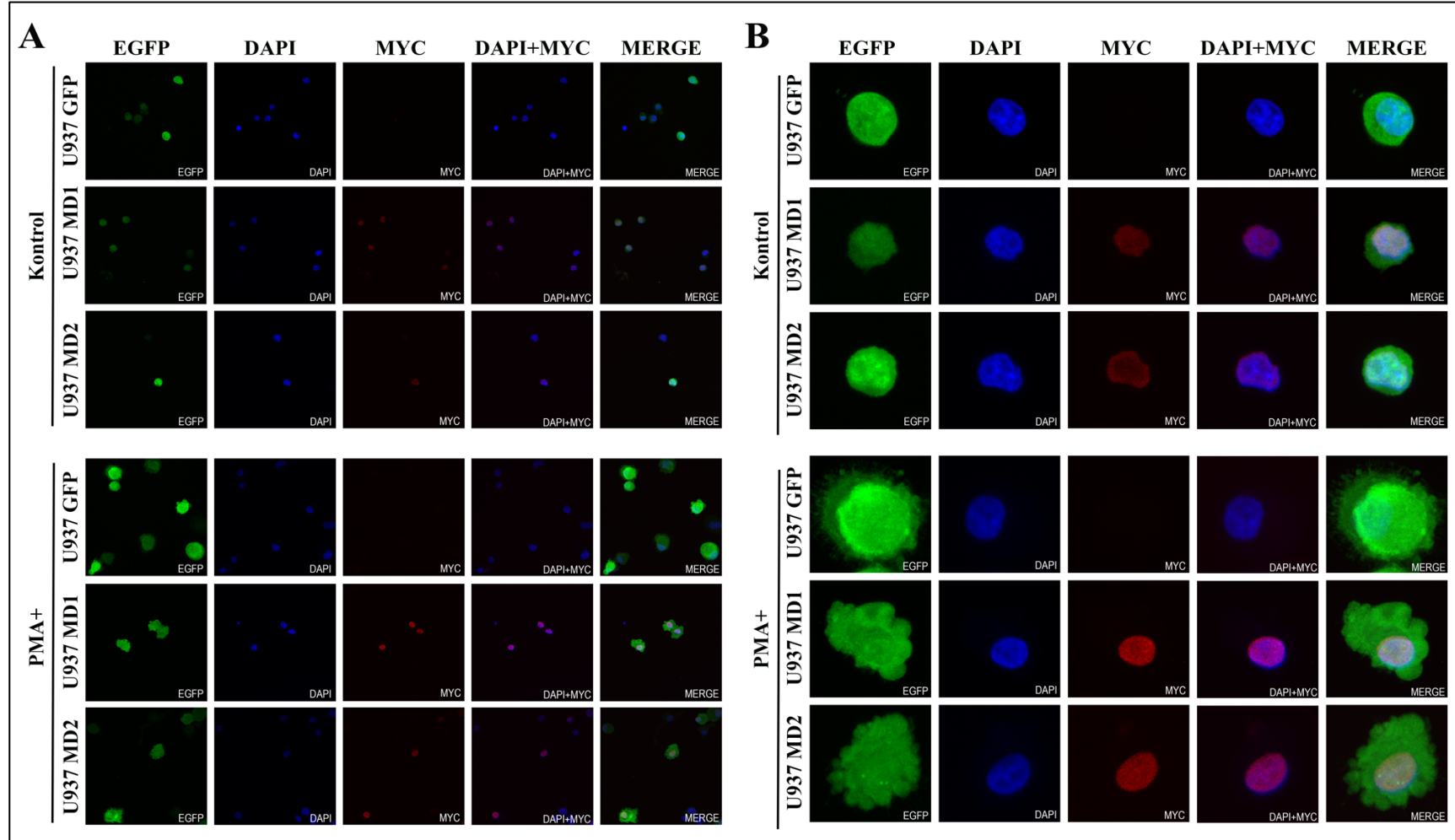
Şekil 5.14: U937 hücre hattı total proteinleri (GFP, MD1, MD2) ve CM örneklerinin ELISA yöntemiyle incelenmesi. Üç tekrar olarak çalışılan bir deneyin sonucu gösterilmiştir.

5.6.Modifiye Edilmiş U937 Hücrelerinin PMA ile Farklılaştırılması ve DEK İzofomları Lokalizasyonun Araştırılması

Hücre kültüründe replikasyon devamlılığı gösteren insan makrofaj hücre hattı olmadığından makrofaj benzeri biyolojik özellikleri çalışmak için insan U937, THP-1 veya HL60 gibi hücre hatları kullanılmaktadır [Daigneault et al., 2010]. Makrofaj farklılaşması için Vitamin D3 veya PMA/TPA gibi maddeler kullanılmaktadır [Yang et al., 2017]. Bu maddelerin etkin doz ve uygulama süreleri için daha önce yapılan çalışmalar referans alındı ve tercih edilen 100 ng/ml etkin dozu 48 ve 72 saat denenerek en uygun sürenin 72 saat olduğu belirlendi (Şekil 5.15). U937 hücrelerinin makrofaj benzeri hücrelere PMA ile farklılaşması sonrasında DEK1 ve DEK2 izofomlarının hücre içi lokalizasyonlarında değişme olup olmadığını tespit etmek için, 72 saat 100 ng/ml PMA ile uyarılan hücreler anti-Myc antikoru kullanılarak IF yöntemiyle boyandı. Konfokal mikroskop analizleri, PMA uygulaması ile farklılaşan hücrelerde beklendiği şekilde morfolojik olarak sitoplazma genişlemesi, psödopodi oluşumu gibi değişimler gözlemlendi [Pagliara et al., 2005], [Yang et al., 2017] ancak gerek DEK1 gerekse DEK2 izofomlarının hücre çekirdeğindeki lokalizasyonunda değişme tespit edilmedi (Şekil 5.16 A ve B).



Şekil 5.15: PMA uygulanan (100 ng/ml, 72 saat) ve kontrol parental U937 hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü. Uyarılmış hücreler (PMA) kültür kabına yapışmakta ve çapları uyarılmamış kontrol hücrelerine (normal) göre büyümektedir.



Şekil 5.16: PMA uygulanan ve uygulanmayan U937 hücrelerinde MycDEK1 ve MycDEK2 izoformlarının IF boyama ve konfokal mikroskop analizi (400X) (A: Çok sayıda hücreye odaklanılmış görüntü. B: Tek hücreye odaklanılmış görüntü). Kontrol: PMA ile inkübe edilmemiş hücreler. MYC: anti-Myc antikoru.

6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Nüklear bir protein olan DEK'in iki izoformu literatürde tanımlanmış olup mevcut araştırmalar yoğunlukla DEK'in 1. izoformuna odaklanmıştır. DEK, hücrelerin kendini yenileme, çoğalma, farklılaşma, yaşlanma ve apoptoz gibi çoklu hücresel süreçlerini etkilemektedir [Kappes et al., 2011], [Privette Vinnedge et al., 2013]. DEK proteininin hücresel süreçlerde yer almasının yanında birçok agresif insan tümöründe aşırı ifadesinin hücrelerin çoğalmasına katkıda bulunduğu saptanmıştır. Aynı şekilde DEK2'nin aşırı ifadesi HCC proliferasyonunu arttırmaktadır [Yu et al., 2016]. Mesane kanserinde ise DEK (DEK1) hastaların idrarında tespit edilmiş olmakla birlikte DEK2'nin salgılanmasıyla ilgili bizim bilgimiz dahilinde çalışma mevcut değildir. İlave olarak, DEK izoformlarının Hs27A ve U937 hücrelerinden salgılanmasına dair bilgimiz dahilinde mevcut veri bulunmamaktadır. Bu tez çalışması ile DEK izoformlarının Hs27A ve U937 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi karşılaştırılmış, bu hücrelerden salgılanıp salgılanmadıkları Western blot ve ELISA yöntemiyle test edilmiş ve PMA ile makrofaja farklılaştırılan U937 hücrelerindeki lokalizasyonları araştırılmıştır.

Çalışmamızda DEK1 ve DEK2 proteinlerinin aşırı ifadesi sağlanan U937 ve Hs27A hücrelerinin proliferasyon sonuçları değerlendirildiğinde, kontrol GFP hücrelerine göre DEK izoformlarının bu hücrelerdeki büyüme ve çoğalmaya negatif veya pozitif yönde etkisi olmadığı gözlemlendi. Deneylerimizde kullanılan hücre kültür hatları primer hücrelere kıyasla hızlı büyüme ve çoğalma sergilemesinden dolayı DEK'in fazla ifadesinin bu hücrelerdeki çoğalmayı arttırmada etkisiz kaldığını düşünmekteyiz. Ancak kullandığımız trypan mavisi ile hücre sayım yöntemine ilave olarak başka yöntemlerle de hücre çoğalması deneyinin tekrar edilmesi sonuçların daha güvenilir olarak yorumlanmasını sağlayacaktır.

Sekretom, proteinlerin hücre dışı boşluğa salgılanan bir bölümü olarak tanımlanmaktadır. Geleneksel veya geleneksel olmayan yollarla hücre dışına salgılanan proteinler otokrin, parakrin ve endokrin yollarla hücre iletişim ve etkileşimlerini sağlamaktadır [Zullo et al., 2015]. Hücre ve doku tiplerine göre farklılık gösteren sekretomun bileşenleri, fizyolojik ve patolojik koşullara cevap olarak değişebilmektedir. Sekretomun içerdiği proteinlerin belirlenmesi kanser, otoimmün

hastalıklar ve inflamasyon durumlarında biyobelirteç veya teröpatik hedef olarak kullanılabileceği gibi hastalıkların tedavisi için olası bir aracı olarak da görülmektedir.

Kemik iliği türevli Hs27A hücreleri mezenkimal, stromal hücre özellikleri araştırılırken kullanılan hücre hatlarından biridir. Kök hücre nişlerinin gelişimi için gerekli hücrelerin CD146 yüzey belirtecini eksprese ettiği bilinmektedir [Bianco et al., 2013]. CD146⁺Hs27A hücrelerinden elde edilen şartlandırılmış medyumun klasik monositlere uygulanması ile hücrelerin doku makrofaj fenotipi kazandığı gösterilmiştir [Iwata et al., 2014]. Miyeloid hücrelerin farklılaşması üzerindeki olumlu etkisi ve inflamasyon esnasında kemoatraktan olarak işlev gören DEK proteininin Hs27A hücrelerinin sekretomunda bulunup bulunmadığı bu tez çalışması kapsamında araştırıldı.

Hs27A hücrelerinin IL-8 varlığında veya yokluğunda yapılan kültürlerinden elde edilen medyumlarında (conditioned medium-CM) DEK izoformlarının varlığı Western Blot analizlerinde saptanamadı. Bunun üzerine, medyum toplama protokolü ve Western-Blot yönteminin validasyonu amacıyla çok sayıda sitokin ve kemokin salgıladığı bilinen Hs5 stromal hücre hattından toplanan CM’de IL-6 varlığı araştırıldı [Delk and Farach-carson, 2012]. Hs5 stromal hücre hattından salgılandığı bilinen IL-6 sitokini yapılan Western-Blot sonucunda gösterildi. Rekombinant DEK’in, HKH’lerin proliferasyonunu ve kendini yenilemesini nüklear/hücre içi fonksiyonlara ihtiyaç duymadan arttırdığı literatürde bilinmektedir. Bu yüzden, DEK izoformları salgısının kemik iliği stroma hücrelerinden türevlenen bu hücre hattında olası varlığının araştırılması önemliydi. Western-Blot tekniğine ilave olarak ELISA yöntemi ile de CM’de DEK izoformlarının varlığı araştırıldı. Ancak hem “indirect” hem de “sandwich” ELISA tekniklerinin denenmesine karşın kullandığımız deneysel koşullarda DEK izoformlarının CM’de varlığı tespit edilemedi. Verilerimiz, Hs27A hücrelerinde DEK1 ve DEK2 proteinlerinin bu tez çalışmasında kullandığımız metotla (Western Blot ya da ELISA) tespit edilebilir düzeyde hücre dışına salgılanmadığını göstermektedir. DEK1/2 salgısının görülememesinin deneylerimizde kullandığımız hücre hattı Hs27A’nın protein salgılama profilinin sınırlı seviyede olabileceğini ya da kültür şartlarında primer hücrelere göre protein salgılama profilinde değişiklik olabileceğini düşündürmektedir. Hücre dışı DEK1/2’nin olası rollerini saptayabilmek amacıyla kemik iliği mikroçevresinden türetilen başka hücre hatları araştırılmalıdır. Salgı deneylerinden pozitif sonuç alınamamasının olası nedenleri, kullanılan antikorun proteinin üç boyutlu yapısındayken bağlanma bölgesine ulaşamaması, salgılanan DEK

proteinlerinin kırılması ve kullanılan antikörlerin bu proteini tanınamaması ya da hücre CM'sinde yeterli seviyede DEK izoformunun bulunmaması olabilir.

Bölünme özelliğine sahip insan makrofaj hücre hattının olmaması, primer hücre hatlarının da elde edilmesinin ve kültüre edilmesinin zorluğu yüzünden monosit morfolojisi ve fizyolojisine sahip insan U937, HL60 veya THP-1 hücre hatları makrofaj çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir [Daigneault et al., 2010]. Bu sebeple tez çalışmamda hem monosit hem makrofaj benzeri fonksiyonları çalışmak amacıyla insan U937 pro-monosit hücre hattını model olarak kullandık.

Monositlerde farklılaşmayı indüklemek için en çok kullanılan uyaranlar vitamin-D3 ve PMA'dır. Bu tez çalışmasında, monositten makrofaja farklılaştırılan U937 hücrelerinde forbol ester PMA'nın etkin dozu için daha önce yapılan çalışmalar referans alınarak 100 ng/ml uygulandı [Yang et al., 2017]. Literatürde PMA uygulaması için farklı süreler bulunduğundan dolayı hücreler 48 ve 72 saat PMA ile uyarıldı ve kullanılan doz için en etkin sürenin 72 saat olduğuna karar verildi. U937 hücrelerine PMA uygulanmasıyla beraber hücrelerin çoğalması durmakta, ekspresyonu artan integrinler ve hücre adezyon molekülleri aracılığıyla hücreler kültür kabına yapışarak makrofaja farklılaşmaktadır. Makrofajlar bağışıklık hücrelerinin inflamasyon bölgesine göçünü uyaran kemokinler ve sitokinlerin salınımından ayrıca fagositoz ve antijen sunumundan sorumludur [Guilliams et al., 2014]. Salgılanan DEK'in nötrofiller, sitotoksik T hücreleri ve doğal katil hücreleri için kemoatraktan rolü olması bu çalışma kapsamında kültür ortamında PMA ile makrofaja farklılaşması indüklenen U937 hücrelerindeki DEK1/2 salgısını araştırmaya yönlendirmiştir. Bu hücrelerde DEK izoformlarının hücre dışına salınıp salınmadığı PMA varlığında ve yokluğunda araştırıldı ve Hs27A hücrelerine benzer şekilde bu hücrelerde de Western Blot yöntemiyle tespit edilebilir düzeyde DEK1/2 salgısı gözlemlenemedi. Mor-Vaknin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise primer insan monositlerinden türevlenen makrofaj hücrelerinde DEK proteininin veziküller veya geleneksel olmayan yollarla hücre dışına salındığı ve IL-8'in DEK'in salgılanmasını indüklediği belirtilmiştir [Mor-Vaknin et al., 2006]. Bundan dolayı, U937 hücre hattı IL-8 ile indüklendikten sonra, hücrelerden toplanan CM'de DEK izoformlarının varlığı yine Western Blot yöntemiyle incelendi ancak DEK izoformlarının salgısında IL-8'e bağlı bir indüksiyon gözlenmedi. IL-8 gibi CXC kemokinler N terminalinde reseptör bağlanması için önemli Glu-Leu-Arg (ELR) sekansı içerirken DEK proteininde de benzer ELR sekansının varlığı bildirilmiştir. Ayrıca rekombinant DEK proteinin

CXCR2 ve HSPG bağımlı mekanizmalar aracılığıyla hematopoetik sitokin gibi davrandığına dair elde edilen bulgular IL-8'e benzer bir yolu takip edebileceğine işaret etmektedir. Deneylerde kullanılan DEK1 ve DEK2 plazmitlerine yerleştirilen Myc epitopunun N-terminaline yerleştirilmesi bu proteinin reseptör bağlanması ile ilgili fonksiyonunu negatif yönde etkileyebileceği gibi aynı zamanda DEK1/DEK2'nin hücreden salgılanmasına da olumsuz etki yapıp yapmadığı gelecek çalışmalarda test edilecektir. Bu amaçla, DEK1 ve DEK2'nin N-terminalinde bulunan Myc epitopu, C terminaline eklenerek veya epitop değiştirilerek deneylerin tekrarlanması araştırmaya değer görülmektedir.

U937 hücrelerinin Western Blot ile tespit edilebilecek düzeyde DEK salgısı oluşturmadığı sonucuna varılmasıyla beraber "indirect" ELISA tekniği CM'de ve protein varlığı bilinen hücre lizatlarıyla denenmiş ancak Hs27A hücrelerinde olduğu gibi pozitif bir sonuç elde edilememiştir. DEK izoformları salgılanmasının başka yöntemler kullanılarak test edilmesi elde edilen sonuçların doğruluğunu teyit edecek ya da tersi bir durum söz konusu ise tespit etmemizi sağlayacaktır. Gelecek çalışmalarda ticari ELISA plakalar kullanılarak antikor bağlanma sorunları minimuma indirilebilir. Kullanılan ticari antikorlar yerine farklı bölgeleri hedefleyen antikorlarla deneyler tekrarlanabilir. Ayrıca ultrasantrifüj yöntemi ile protein ve ekzozom izolasyonu yapılarak DEK izoformları salgılanması bu hücrelerde araştırılabilir.

Son olarak, PMA uygulanmasının ardından U937 hücrelerinde DEK izoformlarının nükleer lokalizasyonunun değişip değişmediği immünfloresan boyama ile incelendi. Elde edilen konfokal görüntülerinin incelenmesi sonucunda DEK1 ve DEK2 proteinlerinin salgı deneylerinden elde edilen sonuçlarla uyumlu olarak hücresel lokalizasyonunu yoğunlukla hücre çekirdeğinde koruduğu gözlemlendi. Özetle, özellikle DEK2 izoformunun salgılanmasının hematopoez sürecine etkisi olup olmadığı henüz bilinmemektedir ve bu tez çalışmasında elde ettiğimiz önveriler, DEK2'nin kemik iliği mikroçevresindeki rolünü anlamayı hedefleyecek gelecekteki çalışmalarımızı kurgulamamıza önemli katkıda bulunacaktır.

Bu yüksek lisans tez çalışması TÜBİTAK 118Z765 no'lu 1001 projesi kapsamında desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

Abba M. C., Sun H., Hawkins K. A., Drake, J. A., Hu Y., Nunez M. I., Gaddis S., Shi T., Horvath S., Sahin A., Aldaz C. M., (2007), "Breast cancer molecular signatures as determined by SAGE: Correlation with lymph node status", *Molecular Cancer Research*, 5(9), 881–890.

Ageberg M., Gullberg U., Lindmark A., (2006), "The involvement of cellular proliferation status in the expression of the human proto-oncogene DEK", *Haematologica*, 91(2), 268–269.

Akashi K., Traver D., Miyamoto T., Weissman I. L., (2000), "A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages", *Nature*, 404(6774), 193–197.

Ambrosi T. H., Schulz T. J., (2017), "The emerging role of bone marrow adipose tissue in bone health and dysfunction", *Journal of Molecular Medicine*, 95(12), 1291–1301.

Ancuta P., Rao R., Moses A., Mehle A., Shaw S. K., Luscinskas F. W., Gabuzda D., (2003), "Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16⁺ monocytes", *Journal of Experimental Medicine*, 197(12), 1701–1707.

Arai F., Hirao A., Ohmura M., Sato H., Matsuoka S., Takubo K., Ito K., Koh G. Y., Suda T., (2004), "Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche", *Cell*, 118(2), 149–161.

Arnold L., Henry A., Poron F., Baba-Amer Y., Van Rooijen N., Plonquet A., Gherardi R. K., Chazaud B., (2007), "Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis", *Journal of Experimental Medicine*, 204(5), 1057–1069.

Auffray C., Fogg D., Garfa M., Elain G., Join-Lambert O., Kayal S., Sarnacki S., Cuman A., Lauvau G., Geissmann F., (2007), "Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior" *Science*, 317(August), 666–670.

Belaid-Choucair Z., Lepelletier Y., Poncin G., Thiry A., Humblet C., Maachi M., Beaulieu A., Schneider E., Briquet A., Mineur P., Lambert C., Mendes-Da-Cruz D., Ahui M. L., Asnafi V., Dy M., Boniver J., Nussgens B. V., Hermine O., Defresne M. P., (2008), "Human Bone Marrow Adipocytes Block Granulopoiesis Through Neuropilin-1-Induced Granulocyte Colony-Stimulating Factor Inhibition" *Stem Cells*, 26(6), 1556–1564.

Bernitz J. M., Kim H. S., MacArthur B., Sieburg H., Moore K., (2016), "Hematopoietic Stem Cells Count and Remember Self-Renewal Divisions", *Cell*, 167(5), 1296–1309.

Bianco P., Cao X., Frenette P. S., Mao J. J., Robey P. G., Simmons P. J., Wang C. Y.,

(2013) "The meaning, the sense and the significance: Translating the science of mesenchymal stem cells into medicine", *Nature Medicine*, 19(1), 35–42.

Böhm F., Kappes F., Scholten I., Richter N., Matsuo H., Knippers R., Waldmann T., (2005), "The SAF-box domain of chromatin protein DEK", *Nucleic Acids Research*, 33(3), 1101–1110.

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

Broxmeyer H. E., Orschell C. M., Clapp D. W., Hangoc G., Cooper S., Plett P. A., Liles W. C., Li X., Graham-Evans B., Campbell T. B., Calandra G., Bridger G., Dale D. C., Srour E. F., (2005), "Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist", *Journal of Experimental Medicine*, 201(8), 1307–1318.

Capitano M. L., Broxmeyer H. E., (2017), "A role for intracellular and extracellular DEK in regulating hematopoiesis" In *Current Opinion in Hematology*, 24(4), 300–306.

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

Casas S., Nagy B., Elonen E., Aventín A., Larramendy M. L., Sierra J., Ruutu T., Knuutila S., (2003), "Aberrant expression of HOXA9, DEK, CBL and CSF1R in acute myeloid leukemia", *Leukemia and Lymphoma*, 44(11), 1935–1941.

Chanput W., Mes J. J., Wichers H. J., (2014), "THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach" *International Immunopharmacology*, 23(1), 37–45.

Charo I. F., Ransohoff R. M., (2006), "The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation" *New England Journal of Medicine*, 354(6), 610–621.

Ciaffoni F., Cassella E., Varricchio L., Massa M., Barosi G., Migliaccio A. R., (2015), "Activation of non-canonical TGF- β 1 signaling indicates an autoimmune mechanism for bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis", *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 54(3), 234–241.

Corre J., Barreau C., Cousin B., Chavoin J. P., Caton D., Fournial G., Penicaud L., Casteilla L., Laharrague P., (2006), "Human Subcutaneous Adipose Cells Support Complete Differentiation But Not Self-Renewal of Hematopoietic Progenitors", *Journal Cellular Physiology*, 208, 282–288.

Crisan M., Yap S., Casteilla L., Chen C. W., Corselli M., Park T. S., Andriolo G., Sun B., Zheng B., Zhang L., Norotte C., Teng P. N., Traas J., Schugar R., Deasy B. M., Badylak S., Buhring H. J., Giacobino J. P., Lazzari L., Péault B., (2008), "A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs", *Cell*

Stem Cell, 3(3), 301–313.

Cros J., Cagnard N., Woollard K., Patey N., Zhang S. Y., Senechal B., Puel A., Biswas S. K., Moshous D., Picard C., Jais J. P., D'Cruz D., Casanova J. L., Trouillet C., Geissmann F., (2010), "Human CD14 Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors", *Immunity*, 33(3), 375–386.

Daigneault M., Preston J. A., Marriott H. M., Whyte M. K. B., Dockrell D. H., (2010), "The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages", *PLoS One*, 5(1), e8668.

Datta A., Adelson M. E., Mogilevkin Y., Mordechai E., Sidi A. A., Trama J. P., (2011), "Oncoprotein DEK as a tissue and urinary biomarker for bladder cancer", *BMC Cancer*, 11(1), 234.

de Albuquerque Oliveira A. C., Kappes F., Martins D. B. G., de Lima Filho J. L., (2018), "The unique DEK oncoprotein in women's health: A potential novel biomarker", In *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 106, 142–148.

Delk N. A., Farach-carson M. C., (2012), "Interleukin-6 A bone marrow stromal cell paracrine signal that induces neuroendocrine differentiation and modulates autophagy in bone metastatic PCa cells", *Autophagy*, 8(4), 650–663.

Denning-Kendall P., Singha S., Bradley B., Hows J., (2003), "Cobblestone Area-Forming Cells in Human Cord Blood Are Heterogeneous and Differ from Long-Term Culture-Initiating Cells", *Stem Cells*, 21, 694–701.

Dennis J. E., Charbord P., (2002), "Origin and Differentiation of Human and Murine Stroma" *Stem Cells*, 20, 205–214.

Devany M., Kappes F., Chen K.-M., Markovitz D. M., Matsuo H., (2008), "Solution NMR structure of the N-terminal domain of the human DEK protein", *Protein Science*, 17(2), 205–215.

Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F. C., Krause D. S., Deans R. J., Keating A., Prockop D. J., Horwitz E. M., (2006), "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells", *Cytotherapy*, 8(4), 315–317.

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

Dong X., Wang J., Kabir F. N., Shaw M., Reed A. M., Stein L., Andrade L. E. C., Trevisani V. F. M., Miller M. L., Fujii T., Akizuki M., Pachman L. M., Satoh M., Reeves W. H., (2000), "Autoantibodies to DEK oncoprotein in human inflammatory disease", *Arthritis and Rheumatism*, 43(1), 85–93.

Evans A. J., Gallie B. L., Jewett M. A. S., Pond G. R., Vandezande K., Underwood J., Fradet Y., Lim G., Marrano P., Zielenska M., Squire J. A., (2004), "Defining a 0.5-Mb Region of Genomic Gain on Chromosome 6p22 in Bladder Cancer by

Quantitative-Multiplex Polymerase Chain Reaction", *American Journal of Pathology*, 164(1), 285–293.

Ginhoux F., Guillems M., (2016), "Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis", *Immunity*, 44(3), 439–449.

Ginhoux F., Jung S., (2014), "Monocytes and macrophages: Developmental pathways and tissue homeostasis", *Nature Reviews Immunology*, 14(6), 392–404.

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

Griffith J. W., Sokol C. L., Luster A. D., (2014), "Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity", *Annual Review of Immunology*, 32(1), 659–702.

Guba S. C., Sartor C. I., Gottschalk L. R., Ye-Hu J., Mulligan T., Emerson S. G., (1992), "Bone marrow stromal fibroblasts secrete interleukin-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the absence of inflammatory stimulation: Demonstration by serum-free bioassay, enzyme-linked immunosorbent assay, and reverse transcriptase poly", *Blood*, 80(5), 1190–1198.

Guerriero A., Worford L., Kent Holland H., Guo G. R., Sheehan K., Waller E. K., (1997), "Thrombopoietin is synthesized by bone marrow stromal cells", *Blood*, 90(9), 3444–3455.

Guillems M., Ginhoux F., Jakubzick C., Naik S. H., Onai N., Schraml B. U., Segura E., Tussiwand R., Yona S., (2014), "Dendritic cells, monocytes and macrophages: A unified nomenclature based on ontogeny", *Nature Reviews Immunology*, 14(8), 571–578.

Gurevitch O., Slavin S., Resnick I., Khitrin S., Feldman A., (2009), "Mesenchymal progenitor cells in red and yellow bone marrow", *Folia Biologica*, 55(1), 27–34.

Harris P., Ralph P., (1985), "Human leukemic models of myelomonocytic development: A review of the HL-60 and U937 cell lines", *Journal of Leukocyte Biology*, 37(4), 407–422.

Hayashida K., Nanki T., Girschick H., Yavuz S., Ochi T., Lipsky P. E., (2001), "Synovial stromal cells from rheumatoid arthritis patients attract monocytes by producing MCP-1 and IL-8", *Arthritis Research*, 3(2), 118–126.

He N., Zhang L., Cui J., Li Z., (2014), "Bone Marrow Vascular Niche: Home for Hematopoietic Stem Cells", *Bone Marrow Research*, 2014, 1–8.

Henning L. N., Azad A. K., Parsa K. V. L., Crowther J. E., Tridandapani S., Schlesinger L. S., (2008), "Pulmonary Surfactant Protein A Regulates TLR Expression and Activity in Human Macrophages", *The Journal of Immunology*, 180(12), 7847–

Horowitz M. C., Berry R., Holtrup B., Sebo Z., Nelson T., Fretz J. A., Lindskog D., Kaplan J. L., Ables G., Rodeheffer M. S., Rosen C. J., (2017), "Bone marrow adipocytes", *Adipocyte*, 6(3), 193–204.

Hurst S. M., Wilkinson T. S., McLoughlin R. M., Jones S., Horiuchi S., Yamamoto N., Rose-John S., Fuller G. M., Topley N., Jones S. A., (2001), "IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation", *Immunity*, 14(6), 705–714.

Ingersoll M. A., Spanbroek R., Lottaz C., Gautier E. L., Frankenberger M., Hoffmann R., Lang R., Haniffa M., Collin M., Tacke F., Habenicht A. J. R., Ziegler-Heitbrock L., Randolph G. J., (2010), "Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets", *Blood*, 115(3), 10-19.

Iwasaki H., Suda T., (2009), "Cancer stem cells and their niche", *Cancer Science*, 100(7), 1166–1172.

Iwata M., Awaya N., Graf L., Kahl C., Torok-Storb B., (2004), "Human marrow stromal cells activate monocytes to secrete osteopontin, which down-regulates Notch1 gene expression in CD34+ cells", *Blood*, 103(12), 4496–4502.

Iwata M., Sandstrom R. S., Delrow J. J., Stamatoyannopoulos J. A., Torok-Storb B., (2014), "Functionally and phenotypically distinct subpopulations of marrow stromal cells are fibroblast in origin and induce different fates in peripheral blood monocytes", *Stem Cells and Development*, 23(7), 729–740.

Jakubzick C. V., Randolph G. J., Henson P. M., (2017), "Monocyte differentiation and antigen-presenting functions", *Nature Reviews Immunology*, 17(6), 349–362.

Kany S., Vollrath J. T., Relja B., (2019), "Cytokines in inflammatory disease", *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 1–31.

Kappes F., Burger K., Baack M., Fackelmayer F. O., Gruss C., (2001), "Subcellular Localization of the Human Proto-oncogene Protein DEK", *The Journal of Biological Chemistry*, 276(28), 26317–26323.

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

Kappes F., Scholten I., Richter N., Gruss C., Waldmann T., (2004b), "Functional Domains of the Ubiquitous Chromatin Protein DEK", *Molecular and Cellular Biology*, 24(13), 6000–6010.

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

Development, 25(7), 673–678.

Kawamura S., Onai N., Miya F., Sato T., Tsunoda T., Kurabayashi K., Yotsumoto S., Kuroda S., Takenaka K., Akashi K., Ohteki T., (2017), "Identification of a Human Clonogenic Progenitor with Strict Monocyte Differentiation Potential: A Counterpart of Mouse cMoPs", *Immunity*, 46(5), 835-848.

Kelly P., Meade K. G., O'Farrelly C., (2019), "Non-canonical inflammasome-mediated IL-1 β production by primary endometrial epithelial and stromal fibroblast cells is NLRP3 and caspase-4 dependent", *Frontiers in Immunology*, 10(102), 1-17.

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

Kim J., Gee H. Y., Lee M. G., (2018), "Unconventional protein secretion – new insights into the pathogenesis and therapeutic targets of human diseases", *Journal of Cell Science*, 131(12), jcs213686.

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

Kondoh N., Wakatsuki T., Akihide R., Hada A., Aihara T., Horiuchi S., Goseki N., Matsubara O., Takenaka K., Shichita M., Tanaka K., Shuda M., Yamamoto M., (1999), "Identification and characterization of genes associated with human hepatocellular carcinogenesis", *Cancer Research*, 59(19), 4990–4996.

Kroes R. A., Jastrow A., McLone M. G., Yamamoto H., Colley P., Kersey D. S., Yong V. W., Mkrdichian E., Cerullo L., Leestma J., Moskal J. R., (2000), "The identification of novel therapeutic targets for the treatment of malignant brain tumors", *Cancer Letters*, 156(2), 191–198.

Kurotaki D., Sasaki H., Tamura T., (2017), "Transcriptional control of monocyte and macrophage development", *International Immunology*, 29(3), 97–107.

Li X., Wan T., Zhang S., Li D., Han X., (2016), "Quantitative proteomic analysis and comparison of two bone marrow stromal cell lines using the SILAC method", *Experimental Hematology*, 44(11), 1059–1071.

Lin L., Piao J., Gao W., Piao Y., Jin G., Ma Y., Li J., Lin Z., (2013), "DEK over expression as an independent biomarker for poor prognosis in colorectal cancer", *BMC Cancer*, 13(336), 1-9.

Lioté F., Boval-Boizard B., Weill D., Kuntz D., Wautier J. L., (1996), "Blood monocyte activation in rheumatoid arthritis: Increased monocyte adhesiveness, integrin expression, and cytokine release", *Clinical and Experimental Immunology*, 106(1), 13–19.

Liu L., Zubik L., Collins F. W., Marko M., Meydani M., (2004), "The antiatherogenic potential of oat phenolic compounds", *Atherosclerosis*, 175(1), 39–49.

Liu Y., Strecker S., Wang L., Kronenberg M. S., Wang W., Rowe D. W., Maye P., (2013), "Osterix-Cre Labeled Progenitor Cells Contribute to the Formation and Maintenance of the Bone Marrow Stroma", *PLoS One*, 8(8), e71318.

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

Martin-Sanchez F., Diamond C., Zeitler M., Gomez A. I., Baroja-Mazo A., Bagnall J., Spiller D., White M., Daniels M. J. D., Mortellaro A., Penalver M., Paszek P., Steringer J. P., Nickel W., Brough D., Pelegrin P., (2016), "Inflammasome-dependent IL-1 β release depends upon membrane permeabilisation", *Cell Death and Differentiation*, 23(7), 1219–1231.

Mendoza-Coronel E., Castañón-Arreola M., (2016), "Comparative evaluation of in vitro human macrophage models for mycobacterial infection study", *Pathogens and Disease*, 74(6), 1–7.

Miharada K., Hiroyama T., Sudo K., Danjo I., Nagasawa T., Nakamura Y., (2008), "Lipocalin 2-mediated growth suppression is evident in human erythroid and monocyte/macrophage lineage cells", *Journal of Cellular Physiology*, 215(2), 526–537.

Moore K. A., Lemischka I. R., (2006), "Stem cells and their niches", *Science*, 311(5769), 1880–1885.

Moore S. G., Dawson K. L., (1990), "Red and yellow marrow in the femur: Age-related changes in appearance at MR imaging", *Radiology*, 175(1), 219–223.

Mor-Vaknin N., Punturieri A., Sitwala K., Faulkner N., Legendre M., Khodadoust M. S., Kappes F., Ruth J. H., Koch A., Glass D., Petruzzelli L., Adams B. S., Markovitz D. M., (2006), "The DEK Nuclear Autoantigen Is a Secreted Chemotactic Factor", *Molecular and Cellular Biology*, 26(24), 9484–9496.

Mor-Vaknin N., Saha A., Legendre M., Carmona-Rivera C., Amin M. A., Rabquer B. J., Gonzales-Hernandez M. J., Jorns J., Mohan S., Yalavarthi S., Pai D. A., Angevine K., Almburg S. J., Knight J. S., Adams B. S., Koch A. E., Fox D. A., Engelke D. R., Kaplan M. J., Markovitz D. M., (2017), "DEK-targeting DNA aptamers as therapeutics for inflammatory arthritis", *Nature Communications*, 8(14252), 1–13.

Morrisette N., Cold E., Aderem A., (1999), "The macrophage - A cell for all seasons", *Trends in Cell Biology*, 9(5), 199–201.

Mosser D. M., Edwards J. P., (2008), "Exploring the full spectrum of macrophage activation", *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958–969.

- Nemati S., Alizadeh Sardroud H., Baradar Khoshfetrat A., Khaksar M., Ahmadi M., Amini H., Saberianpour S., Delkhosh A., Akbar Movassaghpour A., Rahbarghazi R., (2019), "The effect of alginate–gelatin encapsulation on the maturation of human myelomonocytic cell line U937", *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(1), 25–35.
- Oppenheim J. J., Zachariae C. O. C., Mukaida N., Matsushima K., (1991), "Properties of the Novel Proinflammatory Supergene “Interkrine” Cytokine Family", *Annual Review of Immunology*, 9, 617–648.
- Paccaud J. P., Schifferli J. A., Baggiolini M., (1990), "NAP-1/IL-8 Induced Up-Regulation of CR1 Receptors in Human Neutrophil Leukocytes", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 166(1), 187–192.
- Pagliara P., Lanubile R., Dwikat M., Abbro L., Dini L., (2005), "Differentiation of monocytic U937 cells under static magnetic field exposure", *European Journal of Histochemistry*, 49(1), 75–86.
- Patel A. A., Zhang Y., Fullerton J. N., Boelen L., Rongvaux A., Maini A. A., Bigley V., Flavell R. A., Gilroy D. W., Asquith B., Macallan D., Yona S., (2017), "The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation", *Journal of Experimental Medicine*, 214(7), 1913–1923.
- Perry J. M., Li L., (2007), "Disrupting the Stem Cell Niche: Good Seeds in Bad Soil", *Cell*, 129(6), 1045–1047.
- Pierce J. L., Begun D. L., Westendorf J. J., McGee-Lawrence M. E., (2019), "Defining osteoblast and adipocyte lineages in the bone marrow", *Bone*, 118, 2–7.
- Porter R. L., Calvi L. M., (2008), "Communications between bone cells and hematopoietic stem cells", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 473(2), 193–200.
- Privette Vinnedge L. M., Kappes F., Nassar N., Wells S. I., (2013), "Stacking the DEK: From chromatin topology to cancer stem cells", *Cell Cycle*, 12(1), 51–66.
- Proudfoot A. E. I., Handel T. M., Johnson Z., Lau E. K., LiWang P., Clark-Lewis I., Borlat F., Wells T. N. C., Kosco-Vilbois M. H., (2003), "Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 100(4), 1885–1890.
- Rabouille C., (2017), "Pathways of Unconventional Protein Secretion", *Trends in Cell Biology*, 27(3), 230–240.
- Reagan M. R., Rosen C. J., (2016), "Navigating the bone marrow niche: Translational insights and cancer-driven dysfunction", *Nature Reviews Rheumatology*, 12(3), 154–168.
- Riveiro-Falkenbach E., Soengas M. S., (2010), "Control of tumorigenesis and chemoresistance by the DEK oncogene", *Clinical Cancer Research*, 16(11), 2932–

2938.

Roecklein B. A., Torok-Storb B., (1995), "Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes", *Blood*, 85(4), 997–1005.

Rollins B. J., (1997), "Chemokines", *Blood*, 90(3), 909–928.

Ryningen A., Wergeland L., Glenjen N., Gjertsen B. T., Bruserud Ø., (2005), "In vitro crosstalk between fibroblasts and native human acute myelogenous leukemia (AML) blasts via local cytokine networks results in increased proliferation and decreased apoptosis of AML cells as well as increased levels of proangiogenic Interleukin 8", *Leukemia Research*, 29(2), 185–196.

Sacchetti B., Funari A., Michienzi S., Di Cesare S., Piersanti S., Saggio I., Tagliafico E., Ferrari S., Robey P. G., Riminucci M., Bianco P., (2007), "Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment", *Cell*, 131(2), 324–336.

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

Schofield R., (1978)., "The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell", *Blood Cells Molecules and Diseases*, 4(1–2), 7–25.

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

Serbina N. V., Pamer E. G., (2006)., "Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2", *Nature Immunology*, 7(3), 311–317.

Shi C., Pamer E. G., (2011), "Monocyte recruitment during infection and inflammation", *Nature Reviews Immunology*, 11(11), 762–774.

Shiozawa Y., Havens A. M., Pienta K. J., Taichman R. S., (2008), "The bone marrow niche: Habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites", *Leukemia*, 22(5), 941–950.

Sierakowska H., Williams K. R., Szer I. S., Szer W., (1993), "The putative oncoprotein DEK, part of a chimera protein associated with acute myeloid leukaemia, is an autoantigen in juvenile rheumatoid arthritis", *Clinical and Experimental Immunology*, 94(3), 435–439.

Sims G. P., Rowe D. C., Rietdijk S. T., Herbst R., Coyle A. J., (2010), "HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer", *Annual Review of Immunology*, 28, 367–388.

Smith E. A., Gole B., Willis N. A., Soria R., Starnes L. M., Krumpelbeck E. F., Jegga A. G., Ali A. M., Guo H., Meetei A. R., Andreassen P. R., Kappes F., Vinnedge L. M. P., Daniel J. A., Scully R., Wiesmüller L., Wells S. I., (2017), "DEK is required for homologous recombination repair of DNA breaks", *Scientific Reports*, 7(44662), 1–12.

Snykers S., Henkens T., De Rop E., Vinken M., Fraczek J., De Kock J., De Prins E., Geerts A., Rogiers V., Vanhaecke T., (2009), "Role of epigenetics in liver-specific gene transcription, hepatocyte differentiation and stem cell reprogramming", *Journal of Hepatology*, 51(1), 187–211.

Sørensen T. L., Ransohoff R. M., Strieter R. M., Sellebjerg F., (2004), "Chemokine CCL2 and chemokine receptor CCR2 in early active multiple sclerosis", *European Journal of Neurology*, 11(7), 445–449.

Sorrentino A., Ferracin M., Castelli G., Biffoni M., Tomaselli G., Baiocchi M., Fatica A., Negrini M., Peschle C., Valtieri M., (2008), "Isolation and characterization of CD146⁺ multipotent mesenchymal stromal cells", *Experimental Hematology*, 36(8), 1035–1046.

Squillaro T., Peluso G., Galderisi U., (2016), "Clinical trials with mesenchymal stem cells: An update", *Cell Transplantation*, 25(5), 829–848.

Steinbach F., Thiele B., (1994), "Phenotypic investigation of mononuclear phagocytes by flow cytometry", *Journal of Immunological Methods*, 174(1–2), 109–122.

Stephens T. A., Nikoobpour E., Rider B. J., Leon-Ponte M., Chau T. A., Mikolajczak S., Chaturvedi P., Lee-Chan E., Flavell R. A., Haeryfar S. M. M., Madrenas J., Singh B., (2008), "Dendritic Cell Differentiation Induced by a Self-Peptide Derived from Apolipoprotein E", *The Journal of Immunology*, 181(10), 6859–6871.

Strefford J. C., Foot N. J., Chaplin T., Neat M. J., Oliver R. T. D., Young B. D., Jones L. K. (2001), "The characterisation of the lymphoma cell line U937, using comparative genomic hybridisation and multi-plex FISH", *Cytogenetics and Cell Genetics*, 94(1–2), 9–14.

Sugimoto C., Hasegawa A., Saito Y., Fukuyo Y., Chiu K. B., Cai Y., Breed M. W., Mori K., Roy C. J., Lackner A. A., Kim W.-K., Didier E. S., Kuroda M. J., (2015), "Differentiation Kinetics of Blood Monocytes and Dendritic Cells in Macaques: Insights to Understanding Human Myeloid Cell Development", *The Journal of Immunology*, 195(4), 1774–1781.

Sundstrom C., Nilsson K., (1976), "Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)", *International Journal of Cancer*, 17, 565–577.

Tabé Y., Konopleva M., (2014), "Advances in understanding the leukaemia microenvironment", *British Journal of Haematology*, 164(6), 767–778.

Teng Y., Lang L., Jauregui C. E., (2017), "The Complexity of DEK Signaling in

Cancer Progression", *Current Cancer Drug Targets*, 18(3), 256–265.

Tkach M., Théry C., (2016), "Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go", *Cell*, 164(6), 1226–1232.

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

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

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

Wang D. M., Liu L., Fan L., Zou Z. J., Zhang L. N., Yang S., Li J. Y., Xu W., (2012), "Expression level of DEK in chronic lymphocytic leukemia is regulated by fludarabine and Nutlin-3 depending on p53 status", *Cancer Biology and Therapy*, 13(14), 1522–1528.

Wichmann I., Respaldiza N., Garcia-Lozano J. R., Montes M., Sanchez-Roman J., Nuñez-Roldan A., (2000), "Autoantibodies to DEK oncoprotein in systemic lupus erythematosus (SLE)", *Clinical and Experimental Immunology*, 119(3), 530–532.

Wilkins B. S., Jones D. B., (1995), "Immunohistochemical characterization of intact stromal layers in long-term cultures of human bone marrow", *British Journal of Haematology*, 90(4), 757–766.

Winkler I. G., Sims N. A., Pettit A. R., Barbier V., Nowlan B., Helwani F., Poulton I. J., Van Rooijen N., Alexander K. A., Raggatt L. J., Lévesque J. P., (2010), "Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs", *Blood*, 116(23), 4815–4828.

Wong K. L., Tai J. J. Y., Wong W. C., Han H., Sem X., Yeap W. H., Kourilsky P., Wong S. C., (2011), "Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets", *Blood*, 118(5), 16–31.

Woodbury M. E., Ikezu T., (2014), "Fibroblast growth factor-2 signaling in neurogenesis and neurodegeneration", *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 9(2), 92–101.

Xu H., Manivannan A., Crane I., Dawson R., Liversidge J., (2008), "Critical but divergent roles for CD62L and CD44 in directing blood monocyte trafficking in vivo during inflammation", *Blood*, 112(4), 1166–1174.

Yamamoto T., Sakaguchi N., Hachiya M., Nakayama F., Yamakawa M., Akashi M., (2009), "Role of catalase in monocytic differentiation of U937 cells by TPA: Hydrogen peroxide as a second messenger", *Leukemia*, 23(4), 761–769.

Yáñez A., Coetzee S. G., Olsson A., Muench D. E., Berman B. P., Hazelett D. J., Salomonis N., Grimes H. L., Goodridge H. S., (2017), "Granulocyte-Monocyte Progenitors and Monocyte-Dendritic Cell Progenitors Independently Produce Functionally Distinct Monocytes", *Immunity*, 47(5), 890-902.

Yang J., Zhang L., Yu C., Yang X. F., Wang H., (2014), "Monocyte and macrophage differentiation: Circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases", *Biomarker Research*, 2(1), 1–9.

Yang L., Dai F., Tang L., Le Y., Yao W., (2017), "Macrophage differentiation induced by PMA is mediated by activation of RhoA/ROCK signaling", *The Journal of Toxicological Sciences*, 42(6), 763-771.

Yona S., Kim K.-W., Wolf Y., Mildner A., Varol D., Breker M., Strauss-Ayali D., Viukov S., Gulliams M., Misharin A., Hume D. A., Perlman H., Malissen B., Zelzer E., Jung S., (2013), "Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis", *Immunity*, 38(1), 79–91.

Yonekura S., Nagao T., Arimori S., (1985), "Increased growth and collagen synthesis of bone marrow fibroblasts from patients with chronic myelocytic leukaemia", *British Journal of Haematology*, 61(1), 93–99.

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

Zawada A. M., Rogacev K. S., Rotter B., Winter P., Marell R. R., Fliser D., Heine G. H., (2011), "SuperSAGE evidence for CD14 ++CD16 + monocytes as a third monocyte subset", *Blood*, 118(12), 50–61.

Zullo J., Matsumoto K., Xavier S., Ratliff B., Goligorsky M. S., (2015), "The cell secretome, a mediator of cell-to-cell communication", *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 120, 17–20.

ÖZGEÇMİŞ

Büşra Çelik, 2013 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Temel Bilimler Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 2018 yılında tamamladıktan sonra aynı yıl Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Yüksek lisans eğitim süresi esnasında TÜBİTAK 1001 proje asistanı olarak çalıştı.

EKLER

Ek A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayın

Çelik B., Özçelik E., Çetin M., Kandilci A., (2021), “DEK1 ve DEK2 Aşırı İfadesinin U937 Hücre Hattının Biyolojisine Etkilerinin Araştırılması”, GTÜ Fen Bilimleri Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu, Gebze, Kocaeli, Türkiye, 10-11 Haziran.