



**DİFFÜZ BÜYÜK B-HÜCRELİ LENFOMALARDA *GADD45* γ
METİLASYON DÜZEYİNİN YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ ERİME
ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ VE APOPTOZ İLE OLASI
KORELASYONUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

İ. Cansu BARIŞ

**Temmuz 2013
DENİZLİ**

**DİFFÜZ BÜYÜK B-HÜCRELİ LENFOMALARDA *GADD45*
METİLASYON DÜZEYİNİN YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ ERİME
ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ VE APOPTOZ İLE OLASI
KORELASYONUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Pamukkale Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İ. Cansu BARIŞ

Danışman: Doç.Dr. Vildan CANER

**Temmuz, 2013
DENİZLİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

İkbal Cansu BARIŞ tarafından, Doç. Dr. Vildan CANER yönetiminde hazırlanan "Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomalarda GADD45y Metilasyon Düzeyinin Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi İle Belirlenmesi ve Apoptoz ile Olası Korelasyonun Değerlendirilmesi" başlıklı tez tarafımızdan okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Gülseren BAĞCI
Jüri Başkanı

V. CANER
Doç. Dr. Vildan CANER
Jüri Üyesi

E. TEPELİ
Yrd. Doç. Dr. Emre TEPELİ
Jüri Üyesi (Danışman)

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 26.17.13 tarih ve 12/12-8 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Z. BOR KÜÇÜKATAY
Müdür

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek aldığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı başta değerli tez danışman hocam Doç. Dr. Vildan CANER'e,

Bu tez çalışmamda kullandığım materyallerin temin edilmesinde ve analizlerinde her türlü desteği sağlayan değerli hocam Doç. Dr. Nilay ŞEN TÜRK'e,

Tez çalışmamda kullandığım materyallerle ilgili bilgilerin temin edilmesinde her türlü yardımı sağlayan Yard.Doç.Dr. Sibel KABUKÇU HACIOĞLU'na,

Bu süreçte çalışmalarımı destekleyen Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Gülseren BAĞCI'ya,

İçten yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Özge CAN, Levent ELMAS, Ayşen Buket ER'e,

Tez projemi destekleyen Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Ve beni bugünlere getiren, tüm hayatım boyunca her koşulda yanımda olan canım aileme ve dostlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezin tasarımı, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza :

Öğrenci Adı Soyadı : İ. Cansu BARIŞ

ÖZET

**DİFFÜZ BÜYÜK B-HÜCRELİ LENFOMALARDA *GADD45*γ
METİLASYON DÜZEYİNİN YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ ERİME
ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ VE APOPTOZ İLE OLASI
KORELASYONUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

BARIŞ, İ.Cansu
Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Vildan CANER

Temmuz 2013, 114 sayfa

Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma (DBBHL), yetişkin bireylerde Hodgkin dışı lenfomaların en yaygın tipi olmakla birlikte klinik, immunofenotipik ve genetik özellikler açısından heterojen bir yapı göstermektedir. DBBHL'nın patogeneğinde, hücre döngüsü ve apoptotik yollarda düzensizliğe neden olan farklı mekanizmalar rol oynamaktadır. “*Growth Arrest DNA Damage-Inducible 45*”(GADD45) gen ailesi bu mekanizmalarda yer alan önemli bir gen ailesidir.

Bu çalışmanın amaçları DBBHL doku örnekleri ve reaktif lenfoid doku örneklerinde *i) GADD45*γ'nın metilasyon sıklığını belirlemek, *ii) metilasyon durumu ile protein ekspresyon düzeyi arasındaki korelasyonu değerlendirmek*, ve *iii) GADD45*γ'nın metilasyon ve ekspresyon durumlarının apoptozla olan ilişkisi belirlemektir. Bu çalışmada, 40 DBBHL ve 40 reaktif lenfoid doku (RLD) örnekleri değerlendirildi. GADD45γ metilasyon durumu HRM analiziyle, GADD45γ, Bcl-2 ve Bcl-X_L ekspresyonları immunohistokimya ve apoptotik indeks (AI) değerleri TUNEL yöntemi ile belirlendi.

DBBHL'de GADD45γ metilasyon sıklığı yüksek (%55) bulundu. Aynı zamanda, ileri evre olgularda GADD45γ metilasyonunun, erken evre olgulara oranla yüksek olduğu belirlendi ($P=0.041$). GADD45γ aşırı ekspresyonu DBBHL'li ve RLD'li olgularda sırası ile %45 ve %5 olarak belirlendi ve fark anlamlı bulundu ($P=0.000$). İki olgu grubu arasında Bcl-2 ekspresyonu açısından anlamlı fark belirlenirken ($P=0.000$), Bcl-x_L protein ekspresyonu açısından anlamlı bir ilişki bulunamadı ($P=0.154$). Aynı zamanda, iki grup arasında AI değerleri açısından anlamlı bir farklılık yoktu ($P=1.000$).

Bu çalışmadan elde edilen veriler; *i) solid tümörlerin aksine, DBBHL'de GADD45*γ metilasyon sıklığının yüksek olduğunu, *ii) GADD45*γ geninde gözlenen

bu epigenetik değişimin DBBHL'nin progresyonunda rol oynayabileceğini ve *iii*) DBBHL'de *GADD45γ*'nin, tek başına hücreleri apoptoza yönlendirmediğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma, *GADD45γ*, DNA metilasyonu, Bcl-2, Bcl-x_L, apoptoz

ABSTRACT

DETERMINATION OF *GADD45γ* METHYLATION BY HIGH RESOLUTION MELTING ANALYSIS IN DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA AND EVALUATION OF THE POSSIBLE CORRELATION WITH APOPTOSIS

BARIS, I. Cansu

M. Sc. Thesis in Department of Medical Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Vildan CANER

July 2013, 114 pages

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most common type of non-Hodgkin lymphoma among adults and is characterized by heterogeneous clinical, immunophenotypic and genetic features. Different mechanisms deregulating cell cycle and apoptosis play a role in the pathogenesis of DLBCL. “*Growth Arrest DNA Damage-Inducible 45*” (*GADD45*) is an important gene family involved in these mechanisms.

The aims of this study are; *i*) to determine the frequency of *GADD45γ* promoter methylation, *ii*) to evaluate the correlation between *GADD45γ* methylation and protein expression and, *iii*) to investigate the relation between apoptosis and *GADD45γ* methylation and protein expression in DLBCL tissues and reactive lymphoid node tissues (RLT). Forty tissue samples from patients with DLBCL and 40 RLT from patient with reactive lymphoid hyperplasia were investigated in this study. It was used HRM analysis for determination of *GADD45γ* methylation status, immunohistochemistry for protein expression of *GADD45γ*, Bcl-2 and Bcl-x_L, and TUNEL method for apoptotic index (AI).

It was found that the frequency of *GADD45γ* methylation was high (55%) in DLBCL. The methylation frequency for *GADD45γ* was also significantly higher in advanced-stage compared with early-stage ($P=0.041$). Overexpression of *GADD45γ* was found 45% and 5% in DLBCL and RLT groups, respectively and the significant association was observed ($P=0.000$). There was a significant association of Bcl-2 expression between both groups ($P=0.000$) while no significant difference was observed in expression of Bcl-x_L ($P=0.154$). In addition, there was no significant association of AI between both groups.

The results of this study show that *i*) in contrast to solid tumors, the frequency of *GADD45γ* methylation is higher in DLBCL, *ii*) this epigenetic alteration of

GADD45 may associate with DLBCL progression, and *iii) GADD45* is not the only key factor for the cells to direct into the apoptotic process.

Key words: Diffuse large B-cell lymphoma, *GADD45*, DNA methylation, Bcl-2, Bcl-x_L, apoptosis

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
İçindekiler	IX
Şekiller Dizini	XII
Tablolar Dizini	XIII
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini.....	XIV
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER	3
2.1. Hematopoez ve Kan Hücreleri.....	3
2.2. Lenfatik Sistem ve Germinal Merkezler.....	6
2.2.1. Germinal Merkezler.....	7
2.3. Normal Hücre Biyolojisi.....	9
2.3.1. B Hücre Yüzey Reseptörleri.....	9
2.3.2. B Hücre Gelişimi ve Farklılaşması.....	11
2.4. Hematopoetik Neoplaziler.....	13
2.5. GC'ler ve B Hücre Lenfomaları.....	15
2.5.1. B Hücre Lenfomagenezindeki Genetik Değişimlerin Fonksiyonel Sonuçları.....	19
2.6. Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma.....	21
2.6.1. Epidemiyoloji.....	21
2.6.2. Risk Faktörleri.....	24
2.6.3. Klinik Prezantasyon.....	25
2.6.4. Tanı.....	26
2.6.5. Sınıflandırma.....	26

2.6.5.1	Değişimler.....	28
2.6.5.2	Hücre Orijini.....	28
2.6.6	Evreleme ve Risk Değerlendirmesi.....	32
2.6.7	Tedavi.....	34
2.6.8	Karsinogenez.....	35
2.6.8.1	Genetik Aberasyonlar.....	35
2.6.8.1.1	GCB-DBBHL ile İlişkili Genetik Aberasyonlar.....	36
2.6.8.1.2	ABC-DBBHL ile İlişkili Genetik Aberasyonlar.....	37
2.6.8.1.3	PMBL-DBBHL ile İlişkili Genetik Aberasyonlar.....	38
2.6.8.2	Epigenetik Değişimler.....	40
2.6.8.2.1	DNA Metilasyonu.....	41
2.6.8.2.2	DBBHL’de DNA Metilasyon Profili.....	43
2.7.	Growth Arrest DNA Damage-Inducible 45(GADD45) Gen Ailesi.....	47
2.7.1	GADD45 Gen Ailesi Üyeleri.....	47
2.7.2	GADD45 Proteinlerinin Hücre İçi fonksiyonları.....	49
2.7.3	GADD45 Proteinleri NF-κB.....	52
2.7.4	GADD45 Proteinleri ve Hücre Döngüsünde Durma.....	52
2.7.5	GADD45 Proteinleri ve DNA Tamir Mekanizması.....	53
2.7.6	GADD45 Proteinleri ve DNA Demetilasyonu.....	53
2.7.7	<i>GADD45γ</i> Geni.....	55
3.	MATERYAL VE METOD.....	56
3.1	Materyal.....	56
3.2	Formalinle Fikse Edilmiş Parafine Gömülü Doku Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu.....	56
3.2.1	Genomik DNA İzolasyon Protokolü.....	57
3.3	Genomik DNA Örneklerinin Konsantrasyonlarının ve Saflık Derecelerinin Belirlenmesi.....	58
3.4	Bisülfid Uygulaması.....	58
3.4.1	Ön Hazırlık Aşamaları.....	59
3.4.2	Bisülfid Uygulama Protokolü.....	59
3.5	Metilasyona-duyarlı Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi.....	60
3.5.1	Gerçek Zamanlı PCR Optimizasyon Çalışmaları.....	60
3.6	İmmunohistokimya (İHK).....	62
3.7	TUNEL Yöntemi.....	63

3.8		
	Analiz.....	64
4.	BULGULAR.....	65
4.1	Çalışma Grubunu Oluşturan Olgulara Ait Klinikopatolojik Parametreler.....	65
4.2	Çalışma Grubunu Oluşturan Olgularda <i>GADD45γ</i> Metilasyon Durumu.....	66
4.3	<i>GADD45γ</i> Protein Ekspresyonu ve Metilasyon Profili ile İlişkisi.....	68
4.4	Apoptotik Parametreler ve <i>GADD45γ</i> Metilasyon Profili ile İlişkisi.....	70
4.4.1	Bcl-2 ve Bcl-x _L Protein Ekspresyonları.....	70
4.4.2	Bcl-2/Bcl-x _L Protein Ekspresyonları ve <i>GADD45γ</i> Metilasyonu..	71
4.4.3	Apoptotik İndeks(AI) ve <i>GADD45γ</i> , Bcl-2 ve Bcl-x _L Protein Ekspresyonları Arasındaki İlişki.....	72
4.4.4	Apoptotik İndeks ve <i>GADD45γ</i> Promoter Metilasyonu Arasındaki İlişki.....	73
5.	TARTIŞMA.....	75
6.	SONUÇLAR.....	83
7.	KAYNAKLAR.....	86
8.	ÖZGEÇMİŞ.....	98

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Kan hücrelerinin orijinleri ve farklılaşmaları	4
Şekil 2.2 İnsan lenfatik sistemi.....	7
Şekil 2.3 Germinal merkez mikroçevresi.....	8
Şekil 2.4 B-Hücre yüzey reseptörü.....	9
Şekil 2.5 İmmunglobulin gen yeniden düzenlenmeleri	10
Şekil 2.6 B lenfosit gelişimi.....	13
Şekil 2.7 İnsan B-hücre malignensileri.....	15
Şekil 2.8 GM B-Hücrelerinde DNA lezyonları ve fonksiyonel sonuçları.....	17
Şekil 2.9 B Hücre lenfomagenezini uyaran moleküler mekanizmalar.....	20
Şekil 2.10 Farklı lenfoid malignensilerin relatif görülme sıklıkları.....	22
Şekil 2.11 Kadınlarda en sık görülen 10 kanser türünün insidansı.....	23
Şekil 2.12 Erkeklerde en sık görülen 10 kanser türünün insidansı.....	23
Şekil 2.13 Büyük lenfoma hücreleriyle karakterize DBBHL’li bir olguya ait lenf nodülü kesiti.....	27
Şekil 2.14 İmmunohistokimyasal olarak algoritmalarla DBBHL’nin hücre orijininin belirlenmesi ve moleküler klasifikasyon	30
Şekil 2.15 DNA metilasyonunun kimyasal temeli.....	42
Şekil 2.16 Martin Subero ve ark tarafından olgun agresif Hodgkin-dışı lenfomaların lenfomagenezi için önerilen bir model.....	45
Şekil 2.17 DBBHL’de aşırı DNA Metilasyon paterni ile ilişkili genler.....	47
Şekil 2.18 GADD45 izoformların monomerik yapısı ve dizi korunumları.....	48
Şekil 2.19 Strese karşı sinyal iletiminde GADD45 proteinleri.....	50
Şekil 2.20 GADD45 proteinlerinin sekonder yapısı ve etkileşim domainleri.....	51
Şekil 2.21 DNA demetilasyonunda yer alan GADD45 ve kofaktörleri.....	54
Şekil 2.22 <i>GADD45γ</i> geninin yapısı ve CpG adaları.....	55
Şekil 3.1 Farklı $MgCl_2$ konsantrasyonu kullanılarak yapılan optimizasyon çalışmasına ait metilasyona özgün yüksek çözünürlüklü erime eğrisi analizi.....	61
Şekil 4.1 DBBHL olgularında <i>GADD45γ</i> promoter metilasyonuna özgün HRM analizi.....	66
Şekil 4.2 DBBHL ve RLD örneklerinde <i>GADD45γ</i> metilasyon sıklıkları.....	67
Şekil 4.3 DBBHL’li olguda <i>GADD45γ</i> proteininin güçlü (+++) ekspresyon(x200)...	68
Şekil 4.4 DBBHL’li olguda Bcl-2 protein güçlü (+++) ekspresyon(x200)	70
Şekil 4.5 DBBHL’li olguda Bcl-x _L protein güçlü (+++) ekspresyon(x200).....	71
Şekil 4.6 DBBHL’li olguda TUNEL yöntemi ile boyanan apoptotik hücreler.....	72

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1 WHO sınıflandırılmasına göre lenfoid neoplazilerin ana kategorileri ve alt tipleri.....	14
Tablo 2.2 Olgun B-hücre neoplazileri.....	16
Tablo 2.3 DBBHL:WHO 2008 Lenfoma sınıflandırılmasına göre varyantları, alt grupları ve alt tipleri.....	27
Tablo 2.4 Ann-Arbor Evreleme Sistemi.....	32
Tablo 2.5 Uluslararası prognostik indeks (IPI).....	33
Tablo 2.6 IPI'ya ve yaşa-uygun IPI'ya göre 5-yıllık rekürrens bağımsız sağkalımla genel sağkalım oranları.....	33
Tablo 2.7 DBBHL moleküler altgruplarında gözlenen genetik aberasyon ve görülme sıklıkları.....	36
Tablo 2.8 DBBHL moleküler altgrupları ile ilişkili genetik değişimlerin fonksiyonel ve biyolojik sonuçları.....	39
Tablo 3.1 <i>GADD45</i> γpromoter metilasyon düzeyinin belirlenmesinde kullanılan primer setine özgün dizilimler (5'→3')	60
Tablo 3.2 <i>GADD45</i> γ promoter metilasyon durumunu belirlemek amacı ile kullanılan gerçek-zamanlı PCR reaksiyon karışımı	61
Tablo 3.3 <i>GADD45</i> γ için Metilasyon-özgün HRM Analiz Protokolü.....	62
Tablo 4.1 DBBHL'li olgulara ait klinikopatolojik parametreler.....	65
Tablo 4.2 DBBHL'de <i>GADD45</i> γ metilasyon durumunun klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi.....	67
Tablo 4.3 DBBHL'li ve RLD'li olgularda <i>GADD45</i> γ protein ekspresyonu	68
Tablo 4.4 DBBHL'de <i>GADD45</i> γ protein ekspresyonu klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi.....	69
Tablo 4.5 <i>GADD45</i> γ promoter metilasyonu ile protein ekspresyonu arasındaki ilişki.....	69
Tablo 4.6 DBBHL'li ve RLD'li olgularda anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonları...70	
Tablo 4.7 DBBHL'de anti-apoptotik protein ekspresyonları ve <i>GADD45</i> γ metilasyonu arasındaki ilişki.....	72
Tablo 4.8 DBBHL'li ve RLD'li olgularda Apoptotik İndeks ve <i>GADD45</i> γ Bcl-2 ve Bcl-x _L protein ekspresyonları arasındaki ilişki.....	73
Tablo 4.9 DBBHL'de Apoptotik İndeks ve <i>GADD45</i> γ metilasyonu arasındaki ilişki...74	

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

- 5mC:** 5-metilsitozin
ABC: Aktive B-hücre benzeri
AID: Aktivasyon indüklü deaminaz
BCR: B-hücre yüzey reseptörleri
BER: Baz eksizyon tamiri
CLP: Ortak lenfoid progenitör
CMP: Ortak miyeloid progenitör
CR6: Sitokin yanıt geni 6
CSR: Ig sınıf- switch rekombinasyon
CTCF: CCCTC- bağlanan faktör
DBHL: Diffüz Büyük B-hücreli Lenfoma
DNMT: DNA metiltransferaz
TdT: Terminal deoksinükleotidil transferaz
EBF: Erken B-hücre faktörü
EBV: Epstein-Barr virüsü
EZH2: Histon-lizin N-metiltransferaz
FFPE: Formalinle fikse parafine gömülü
GADD45 α, β, γ : Growth Arrest DNA Damage-Inducible 45 α, β, γ
GALT: Barsakla ilişkili lenfoid doku
GC: Germinal merkez
GCB: Germinal merkez B-hücre benzeri
G-CSF: Granülosit-koloni uyarıcı faktör
HCV: Hepatit C virüsü
HHV-8: Kaposi sarkoma ile ilişkili insan herpes virüsü 8
HKH: Hematopoez kök hücre
HRM: High Resolution Melting (Yüksek çözünürlüklü erime)
HSF: Isı Şok Faktörleri
H zinciri: Ig ağır zinciri
Ig: İmmunoglobulin
IGF: İnsülin-benzeri Büyüme Faktörü
I κ B: İnhibitör κ B protein
İHK: İmmunohistokimya
JNK: c-Jun N-terminal kinaz
L zinciri: Ig hafif zinciri
MKK4: MAP kinaz kinaz 4
MKK7: MAP kinaz kinaz 7
MMR: Mismatch tamiri
MTK1: Metil tioriboz kinaz 1
MYC: Myelositomatozis onkogeni
NER: Nükleotid Eksizyon Tamiri
NF- κ B: Nükleer faktör kapa B
NHL: Hodgkin-dışı lenfoma
NK: Doğal öldürücü
OIG37: Onkostatin-M indüklenebilir gen
PCNA: Prolifere Eden Hücre Nükleer Antijeni
PMBL: Primer mediastinal B-hücre lenfoması

PTEN: Fosfataz ve tensin homologu
RAG1: Rekombinasyonu aktive eden gen 1
RAG2: Rekombinasyonu aktive eden gen 2
RLD: Reaktif lenfoid doku
SAH: S-adenozil homosistein
SAMe: S-adenozil-l-metyonin
TA: Transkripsiyonal aktivatör
TF: Transkripsiyon Faktörü
TGF- β : Transforme edici büyüme faktörü β
TP53: Tümör protein 53
TUNEL: ‘Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling’
UTR: ‘Untranslated Region’
V bölgesi: Ig değişken bölgesi

1.GİRİŞ

Kanser, birçok yolla tanımlanabilir. Hipokratın anjiogenez gözlemi ile birlikte, kanser kelimesi tümörleri besleyen ince kan damarlarını tanımlamada kullanıldı. Bir patolog olan Laennec, kanseri farklı gelişim evrelerinde hücrelerin normal olmayan yeni özellikler kazanması olarak tanımlandı. Geçen yüzyılda, Boveri'nin kanserde kromozom anomalilerinin rolünü öne sürmesi ile, kanserin genetik modeli tanımlanmaya başladı. Günümüzde kanserle ilgili temel araştırmalarda ve tümör hücre biyolojisinin altında yatan genetik değişimlerin tanımlanmasında büyük ilerlemeler kaydedilmesine karşın, kanser türleri arasında meydana gelen farklı moleküler değişikliklerin kanserin etyolojisinde ve/veya progresyonundaki rolleri hakkında henüz aydınlatılamayan birçok mekanizma bulunmaktadır.

Epigenetik değişimler de en azından onkogenlerin aktivasyonuna veya tümör baskılayıcı genlerin sessizleşmesine neden olarak kanserin etyolojisinde ve/veya progresyonunda rol oynayan önemli mekanizmalardır. Genetik değişimlere benzer şekilde, kanserde gözlenen epigenetik değişimleri tanımlamada da büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu ilerlemeler, gen-spesifik hipometilasyon ve hipermetilasyon kadar, DNA'nın hipometilasyonu ve kromatinin hipoasetilasyonu gibi global değişimleri içermektedir.

Şu anda çok iyi biliyoruz ki, DNA çift sarmalında bulunan bilginin doğru yorumlanmadığı her durum bir patoloji ile sonuçlanabilmektedir. Günümüzde transkripsiyon düzeyindeki problemler nedeniyle etkilenen ve kanserle ilişkili olduğu belirlenen genlerin sayısı durmadan artmaktadır. Karsinogenez sürecinde yer aldıkları düşünülen bu genler 3 grup altında toplanabilirler. Bunlardan ilk grubu klasik tümör baskılayıcı genler oluşturur ve bu genlerin CpG metilasyonu ile fonksiyon kayıplarına uğramaları, karsinogenezde yer alan ve hemen hemen bilinen tüm yolakları etkiler. Epigenetik olarak sessizleşen genlerin ikinci grubunu aday tümör baskılayıcı genler oluşturmaktadır. Son yıllarda dikkat çekmeye başlayan bu genlerde mutasyonel

inaktivasyonlar nadiren gözlenirken, sıklıkla promoter hipermetilasyonu nedeniyle fonksiyon kaybına uğradıkları bilinmektedir. Ancak, bu genlerin karsinogenez sürecine nasıl katıldıkları net olarak bilinmemektedir. Üçüncü grup genler ise, kanserde promoter hipermetilasyonu ile ilişkili genom çaplı araştırmalar sırasında rastgele identifiye edilen genlerdir ve fonksiyonları tam olarak bilinmemekle birlikte kanser progresyonunda fonksiyonel önemlerinin olabileceği düşünülmektedir.

“*Growth Arrest and DNA Damage Inducible 45*” (*GADD45*) gen ailesi, DNA hasarı ile indüklenen bir gen ailesidir. *GADD45α* (*GADD45*), *GADD45β* (*MyD118*) ve *GADD45γ* (*CR6*) genleri olmak üzere 3 üyeden oluşan *GADD45* gen ailesi; evrimsel olarak korunmuş, birbirleri ile yüksek homoloji gösteren ve çoğunlukla nükleusta lokalize proteinleri kodlar. *GADD45* gen ailesi tarafından kodlanan proteinler, birçok farklı çevresel, fiziksel ve genotoksik stres koşullarında memeli hücrelerin yanıtını integre eden stres sensörleri olarak görev yapmaktadırlar ve bu proteinler önemli tümör baskılayıcılar veya otoimmün baskılayıcılar olarak tanımlanmışlardır.

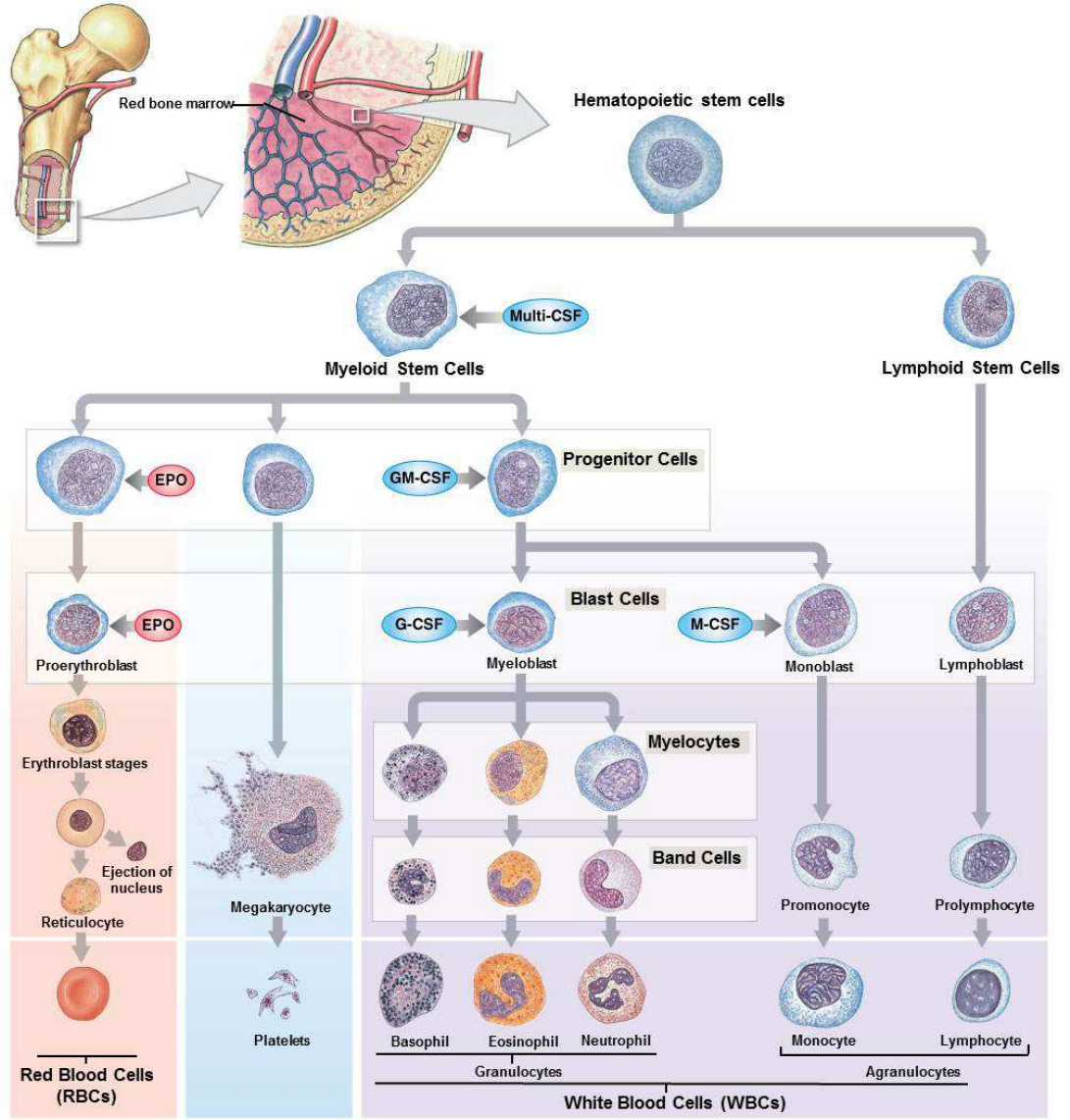
Farklı genotoksik ve çevresel stres ajanları tarafından uyarıldıktan sonra, *GADD45* genlerinin hücre döngüsünün durdurulmasının kontrolünde, DNA tamirinde, hücre canlılığının devamında, apoptozda ve *in vivo* tümör gelişiminde yer aldıkları bildirilmiştir. Önemli rol oynadıkları bu hücrel mekanizmaları, diğer hücrel proteinlerle fiziksel etkileşim göstererek, birlikte gerçekleştirmektedirler. Özellikle, DNA hasarından sonra tüm *GADD45* protein ailesi üyeleri hızla uyarılırlar ve bunun sonucunda ya hücre döngüsünde ve apoptozda durmaya neden olurlar ya da DNA tamir mekanizmasında aktif rol oynarlar. *GADD45* proteinlerinin hücrel homeostazın korunmasında ve stres faktörlerine yanıtta önemli rol oynamaları nedeniyle, bu proteinlerin kanser oluşum sürecinde de yer alabilecekleri düşünülmüştür. *GADD45α* ve *GADD45β* ile ilgili daha detaylı çalışmalar yapılmış olmasına karşın, *GADD45γ* ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Bu tez çalışmasında, Batı toplumlarında yetişkin Hodgkin-dışı lenfomaların en yaygın tipi olan DBBHL’lerin patogeneğinde *GADD45γ* geninin DNA metilasyonu aracılığıyla gerçekleşen fonksiyon kaybının önemine odaklandık. Bu çerçevede 40 adet DBBHL ve 40 adet reaktif lenfoid doku örneklerinde *GADD45γ* metilasyonunu (HRM analizi ile) *GADD45γ*, Bcl-2, Bcl-x_L ekspresyonlarını (IHK ile) ve apoptotik indeksi (TUNEL yöntemi ile) belirlemeyi amaçladık.

2. KURAMSAL BİLGİLER

2.1. Hematopoez ve kan hücreleri

Kemik iliğinde kan hücrelerinin üretim, çoğalma ve özelleşme süreçlerini kapsayan olaylar zinciri hematopoez olarak tanımlanır. Başka bir ifade ile, hematopoez, tüm kan hücre serilerine dönüşme yeteneğinde olan hematopoetik kök hücre (HKH)'nin kendini yenileme, gelişim ve farklılaşma süreçlerini kapsar. Hematopoez sarı kesede başlar ve doğumdan kısa bir süre sonra, hematopoetik kök hücreler karaciğerden kemik iliğine göç ederler. Kemik iliği yaşam boyunca hematopoezin gerçekleştiği primer alan olmakla birlikte, bazı patolojik durumlarda dalak ve karaciğer hematopoezin gerçekleştiği diğer organlar olarak yer alırlar.

Kemik iliğinde HKH'lerin farklı fonksiyonlarını düzenleyen endotel niş (osteoblastik niş) ve vasküler niş (endotelial niş) olmak üzere iki ayrı türde niş bulunur. Bu iki niş birbirinden fiziksel olarak tamamen ayrı olmayıp, birbirleriyle bağlantılıdır. HKH'ler farklı koşullar altında iki nişten birini kullanırlar ve vasküler nişteki HKH sayısı endotel niştekinden daha fazladır. Endotel nişteki HKH'ler kendini yenileme yeteneğinde ve hücre döngüsünün G0 evresinde uykudaki primitif kök hücreler iken, vasküler nişteki HKH'ler daha olgun, proliferasyon yapabilen ve farklılaşmaya yatkın hücrelerdir. HKH'ler, farklı olgun kan hücrelerini oluşturan multipotent progenitor hücrelere farklılaşırlar ve sonrasında "ortak myeloid progenitor (CMP)" ve "ortak lenfoid progenitor (CLP)" olmak üzere 2 farklı ana hücre grubu oluşur. Bu özelleşmiş progenitor hücreler, kemik iliğinde bölünmeye devam ederek olgun beyaz kan hücrelerini, kırmızı kan hücrelerini ve plateletleri oluştururlar (Howard Cedar & Yehudit Bergman 2011, WEB_1) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Kan hücrelerinin orijinleri ve farklılaşmaları (Martini FH vd 2012)

Yetişkin bir erkek vücudunda toplam 4 litre kan bulunurken, kadınlarda ve çocuklarda bu miktar biraz daha düşüktür. Kan; kırmızı kan hücreleri, beyaz kan hücreleri ve plateletler olmak üzere 3 temel hücre tipinin yer aldığı plazmadan oluşmaktadır. Kırmızı kan hücreleri (eritrositler) bikonkav disk şeklinde ve hemoglobin açısından zengin hücrelerdir. Kırmızı kan hücrelerinin temel fonksiyonu akciğerden solunan oksijeni dokulara taşımaktır ve dokulardaki oksijen enerjinin açığa çıkmasında kullanılır. Dokularda oluşan karbondioksit akciğerlere kırmızı kan hücreleri ile taşınır ve soluk verme sırasında vücuttan uzaklaştırılır. Kadınlarda 1 litre kanda $4-5.6 \times 10^{12}$ kırmızı kan hücresi bulunurken, erkeklerde aynı miktardaki kanda bulunan hücre sayısı $4.5-6.5 \times 10^{12}$ 'dir. Bu kadar fazla sayıda kırmızı kan hücresinin bulunması, kanın

karakteristik kırmızı rengini oluşturmaktadır. Kırmızı kan hücrelerinin toplam yaşam ömrü yaklaşık 120 gündür ve bu sürenin sonunda yaşlanma nedeniyle ölürlür. Kırmızı kan hücrelerinin üretimi eripropoietin olarak adlandırılan proteinin kontrolü altındadır. Bu protein %90 oranında böbrekte ve geri kalanı da karaciğer ve diğer organlardan üretilmektedir.

Kanda bulunan bir diğer hücre grubunu plateletler (trombositler) oluşturur. Kanda $150-400 \times 10^9$ /litre platelet hücresi bulunur. Plateletler, trombopoiezis olarak adlandırılan bir mekanizma ile büyük multi-nükleuslu megakaryositlerden oluşurlar. Megakaryositlerin sitoplazmasından ayrılan plateletler kan dolaşımına katılırlar, burada 6-8 gün kaldıktan sonra dalakta parçalanarak yok edilirler. Başlıca karaciğer hücrelerinden üretilen trombopoietin, megakaryosit ve platelet oluşumunu uyaran bir hormondur. Kan damarı bütünlüğü bozulduğunda, plateletler bir arada toplanarak bu alanı kapatırlar ve ayrıca kanın pıhtılaşmasını başlatacak ve/veya devam ettirecek kimyasal mediatörlerin salınımına neden olurlar. Bu nedenle plateletler son derece önemli hücrelerdir.

Kanda daha az sayıda bulunmalarına rağmen fonksiyonları açısından çok daha özelleşmiş hücre grubunu beyaz kan hücreleri (lökositler) oluşturmaktadır. Kandaki miktarları yaklaşık $4-10 \times 10^9$ /litre'dir (Her 600-700 kırmızı kan hücresine karşılık 1 beyaz kan hücresi bulunmaktadır). Granüositler, monositler ve lenfositler olmak üzere 3 ana tip lökosit hücresi bulunmaktadır. Granüositler de nötrofiller, eozinofiller ve bazofiller olmak üzere 3 farklı hücre tipini içermektedir. Lökositler immun sistemin önemli komponentlerini oluşturmaktadırlar ve mikroorganizmalar, kanser hücreleri gibi kendinden olmayan yapıları vücuttan uzaklaştırmada önemli rol oynamaktadırlar. Granüositler ve monositlerin kanda bulunan miktarları sırası ile $2.5-7.5 \times 10^9$ /litre ve 0.2×10^9 /litre'dir. Bu iki hücre tipi, immun fonksiyonları açısından bir arada çalışırlar. Kemik iliğindeki üretimleri başta granüosit-koloni uyarıcı faktör (G-CSF) olmak üzere diğer büyüme faktörlerinin kontrolü altındadır. Nötrofiller, sirkülasyonda yaklaşık 10 saat ile kısa ömre sahiptirler. Eozinofiller özellikle parazitik enfeksiyonlara ve alerjik uyarılara karşı immun yanıtta rol oynarlar. Kanda 0.4×10^9 /litre bulunma miktarı ile, total beyaz kan hücrelerinin yaklaşık %2-5'inin oluştururlar. Bazofiller tüm lökositler içinde, kanda sayıca en az bulunan hücrelerdir ve total lökositlerin sadece %0.2'sini oluştururlar. Aktive edildiklerinde, granüllerinde bulunan histamin ve heparini hücre dışına salarak, hipersensitivite reaksiyonlarının oluşmasında önemli rol oynarlar.

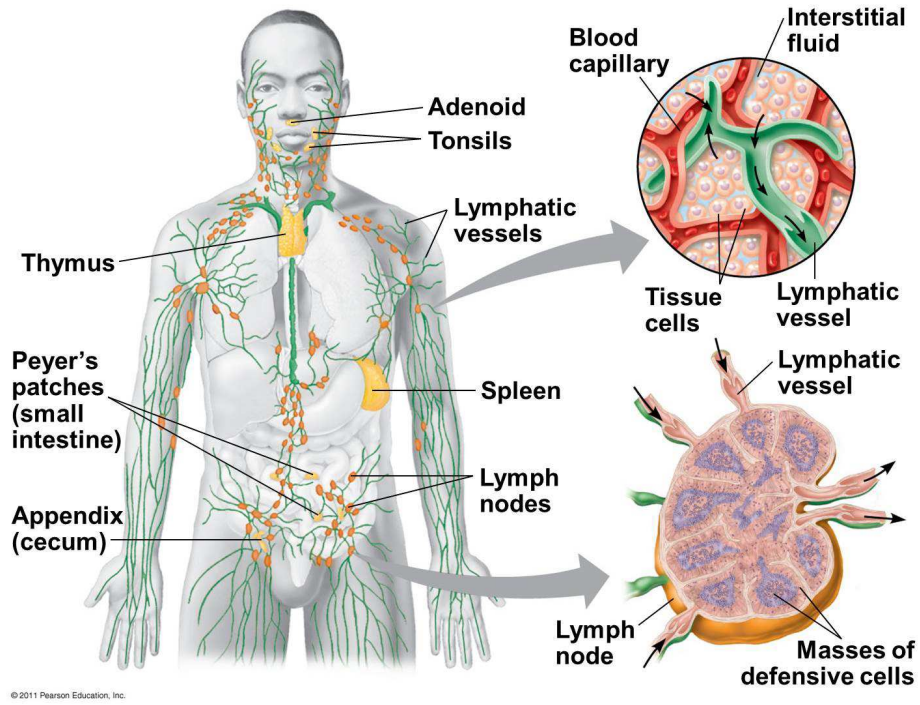
Bazofiller, mast hücreleri olarak adlandırılan bir diğer immun sistem hücresi ile oldukça yakından ilişkidirler ve her iki hücre grubu da hem alerjenlere hem de parazitik patojenlere karşı immun yanıtın oluşumunda yer alırlar. Monositler ise, sirkülasyonda yaklaşık 20-40 saat kalırlar ve daha sonra olgunlaşacakları ve retiküloendotelial sistemin bir parçası olarak fonksiyonlarını gerçekleştirecekleri dokulara göç ederler. Dokularda günlerce hatta aylarca yaşamlarını sürdürürler.

Lenfositler, başlıca kemik iliği olmak üzere timus, dalak ve lenf nodüllerindeki hematopoetik kök hücrelerden köken alırlar. Ortak lenfoid kök hücre olarak adlandırılan bu kök hücre, T hücreleri ve B hücreleri olmak üzere iki tip lenfosit hücresini oluşturmak üzere farklılaşır ve proliferer olur. İnsanlarda periferik kan lenfositlerinin büyük bir bölümünü (%70) oluşturan T lenfositler timusta olgunlaşırken, B lenfositler kemik iliğinde olgunlaşırlar (Martini FH vd 2012, Camcıoğlu Y vd 2007).

2.2. Lenfatik sistem ve germinal merkezler

Lenfositler, lenfatik sistemde bulunan temel hücrelerdir. Lenfatik sistem lenfatik damarlardan ve lenfoid dokulardan oluşan bir sistemdir. Primer veya merkezi (kemik iliği ve timüs) ve sekonder veya periferik (dalak, lenf nodülü ve mukoza-ilişkili lenfoid dokular) olmak üzere 2 tip lenfoid doku bulunmaktadır (Şekil 2.2). İnsan vücuduna dağılmış yaklaşık 600 lenf nodülü vardır ve bu nodüller yoğun lenfatik damar ağı ile çevrelenmiştir. Lenfatik damarlar, lenfositlerin süspanse olduğu lenfi içerirler. Kapiller lenf damarları daha geniş lenf damarlarına drene olurlar ve bu damarlar da kan damarlarına boşalarak kan dolaşımına katılırlar. Böylelikle lenfositlerin kan ve kemik iliğine tekrar dönüşü için sirkülasyon sağlanmış olur.

Lenfatik sistem mikroorganizmalara ve kansere karşı defansta önemli rol oynar. Primer lenfoid organların en önemli görevleri lenfositlerin farklılaşmalarını ve olgunlaşmalarını sağlamak iken, sekonder lenfoid organlar vücuda giren yabancı antijenleri yakalayıp immun yanıtı oluştururlar. Lenf ve kan yoluyla giren antijenlere karşı immun yanıt, genellikle lenf nodülleri (lenf düğümleri) ve dalakta gelişir. Lenf nodülleri tüm vücuda yayılan lenfatik kanalların etrafında yer alan ve lenfoid dokuların bir araya gelmesinde oluşan nodüler yapılardır (Martini FH vd 2012, Abbas vd 2007).



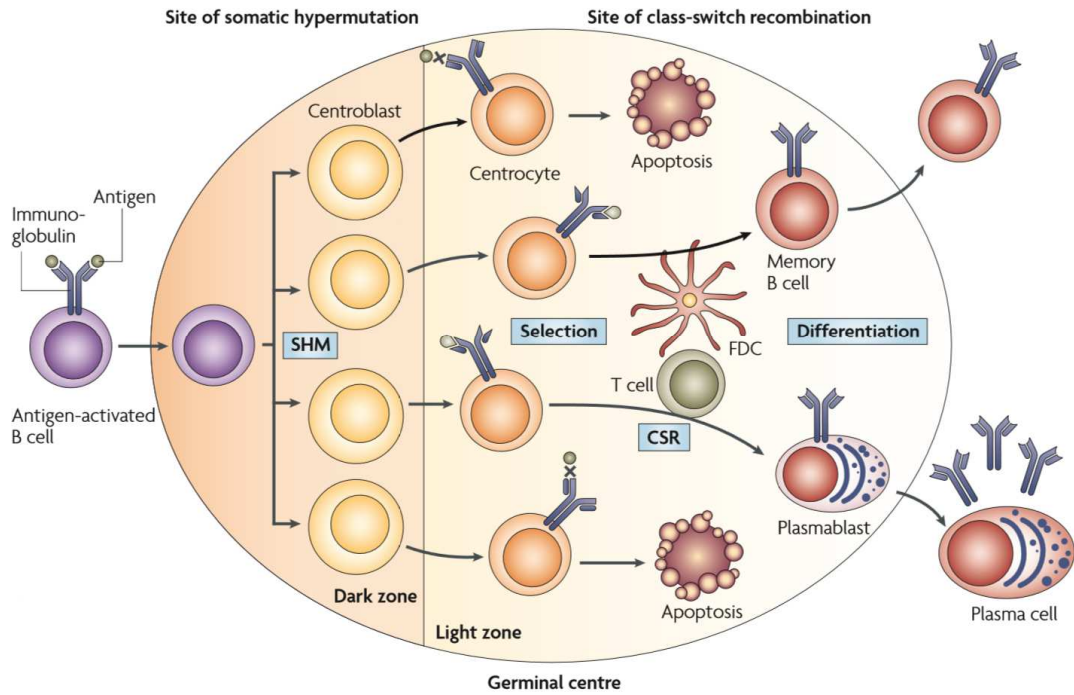
Şekil 2.2 İnsan lenfatik sistemi (Martini FH vd 2012)

2.2.1. Germinal merkezler

Sekonder lenfoid organların anatomik yapısı, immun yanıtın gelişmesini sağlayacak şekilde düzenlenmiştir. Germinal Merkez (GC)'ler sekonder lenfoid organlarda bulunan mikroanatomik yapılardır ve yüksek oranda hücre bölünmeleri ile karakterize histolojik özellikleri nedeniyle bu adı almıştır (Jacob J vd 1991). Immunoglobulin (Ig) değişken (V) bölgelerini kodlayan genlerde gerçekleşen antijen-kökenli somatik hipermutasyonlar GC'lerde meydana gelir ve bu merkezler antikor-salgılayan plazma hücrelerinin ve anı B-hücrelerinin oluştuğu yerlerdir.

Ekzojen antijenle uyarım sonrası T-hücre bağımlı antikor yanıtı sırasında dalak, lenf nodülleri, Payer plakları ve tonsiller gibi periferik lenfoid organların folliküllerinde B hücre proliferasyonu nedeniyle GC'ler oluşur. Naif B hücreler öncelikle T-hücre zengin bölgeye (T-hücre zonu) göç ederler. T-hücre zonunda, B-hücreler CD4+ T hücreler ve antijen sunan hücrelerle etkileşirler ve aktif hale gelirler. Böylece GC yanıtı başlar. Aktive olan B-hücrelerinden direkt olarak antikor-salgılayan plazma hücreleri oluşabilir veya GC-prekürsör B-hücreleri oluşabilir ve primer folliküllere (folliküler dendritik hücre ağı içinde yer alan IgM+IgD+ B-hücrelerin sirküle ettiği alan) göç ederler. B-hücreler burada hızla proliferasyon olurlar. Böylece GC etrafında 'mantle' zonu

oluşturmak üzere IgM+IgD+ B hücre sayısı artar ve sekonder follikül yapısı oluşur. Bu hızlı proliferasyondan birkaç gün sonra GC'in karakteristik yapısı şekillenir (Şekil 2.3). Bu yapıda sentroblastlar olarak bilinen yoğun bir şekilde paketlenmiş proliferere olan B hücrelerden oluşan bir karanlık zon ve folliküler dendritik hücre, T hücre ve makrofaj ağı içinde daha küçük ve bölünmeyen sentrositlerden oluşan aydınlık zon yer almaktadır. Sentroblastlar somatik hipermutasyonla *IgV* genlerini değiştirirler ve yeni oluşmuş modifiye antikorları eksprese eden bu hücreler aydınlık zonda daha gelişmiş antijen bağlanması için seçilirler. Bazı sentrositler sonuçta farklılaşarak plazma hücrelerine ve anı hücrelerine dönüşürler. GC'ler maksimum boyutlarına yaklaşık 2 hafta içinde ulaşırlar ve kaybolmaları haftalar sürebilir. GC mikroçevresi içinde B-hücreleri her zaman karanlık zondan aydınlık zona geçiş yapmaz (Klein U ve Dalla-Favera R. 2008).



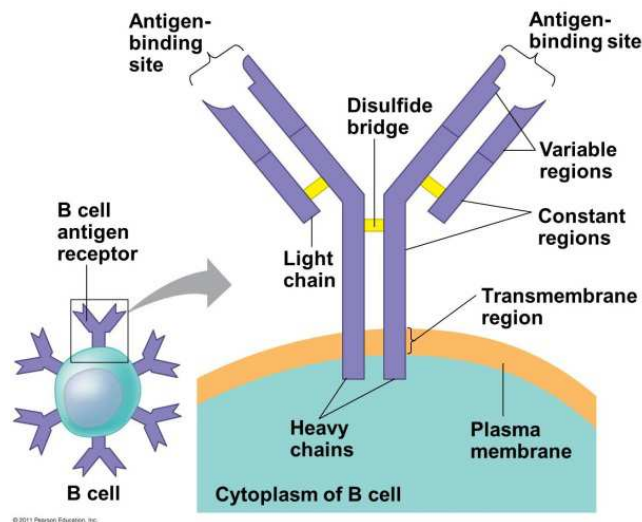
Şekil 2.3. Germinal merkez mikroçevresi. Antijenle-aktive olan B hücreleri, sentroblastlara farklılaşırlar ve sentroblastlar germinal merkezin karanlık zonunda klonal olarak çoğalırlar. Proliferasyon sırasında, *IgV* genlerinde somatik hipermutasyonlar gerçekleşir. Sentroblastlar daha sonra sentrositlere farklılaşırlar ve germinal merkezin aydınlık zonuna göç ederler. Burada antijen reseptörleri modifiye olur. Yeni oluşan sentrositlerden uygun olmayan antikor üretenler apoptozla uzaklaştırılırlar. Bir grup sentrositte ise Ig sınıf-switch rekombinasyon (CSR) gerçekleşir. Antijenle-seçilen sentrositler, daha sonra plazma hücrelerine ve anı hücrelerine farklılaşırlar (Klein U ve Dalla-Favera R 2008).

2. 3. Normal B hücre biyolojisi

Uzun yaşam süreleri nedeniyle vertebralı canlılar, yaşamları boyunca patojen mikroorganizmalar başta olmak üzere birçok tehlike ile karşı karşıyadırlar. Bu tehlikelerin üstesinden gelebilmek için, vertebralı T ve B-hücreleri bu tehlikeleri tanıyabilecek sıradışı geniş bir reseptör profiline sahiptirler.

2.3.1. B hücre yüzey reseptörleri (BCR)

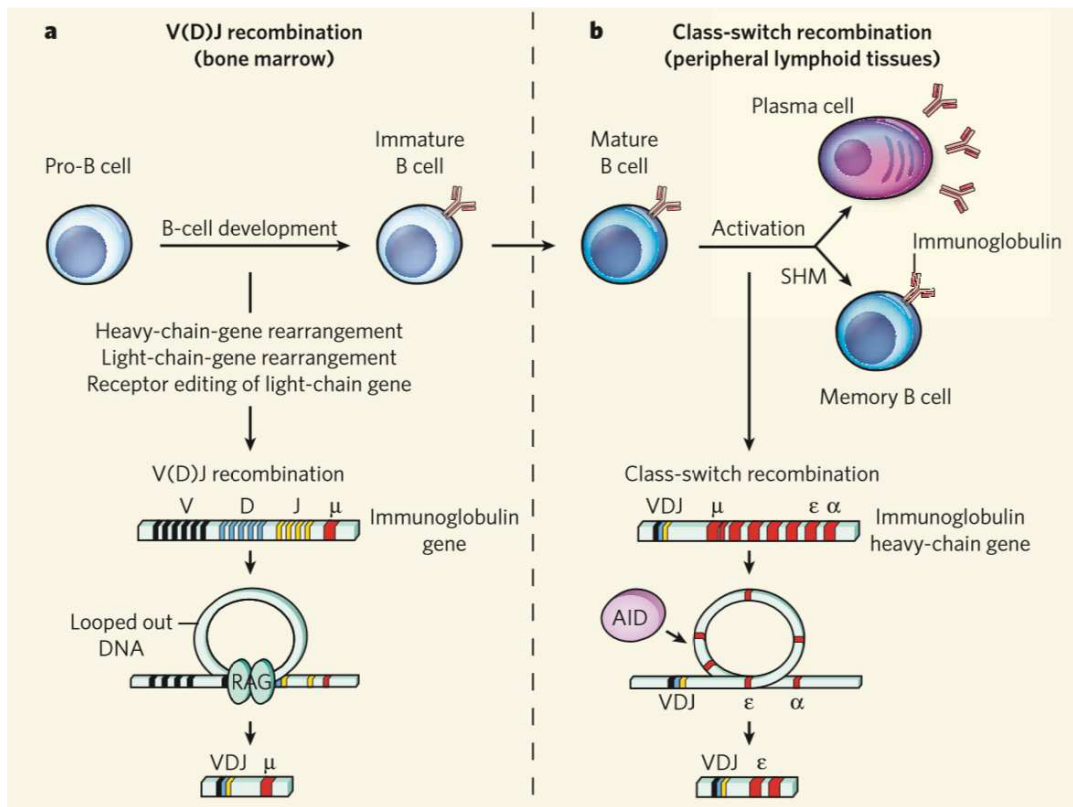
B hücrelerin yüzey reseptörleri (BCR) membrana-bağlı immunglobulin (Ig)'lerdir (Şekil 2.4). B hücre gelişimde, vazgeçilmez tek koşul, B hücre reseptörünü (BCR) oluşturan Ig'nin ağır (H) ve hafif (L) zincir gen bölgelerinde rastgele meydana gelen yeniden düzenlenmelerdir. Ig H zincir genlerinin farklı V (variable), D (diversity) ve J (joining) segmentlerinde yeniden düzenlenmeler gerçekleşirken, aynı genin L zincirinde yeniden düzenlenmeler V ve J segmentlerinde meydana gelir. Rekombinasyonda, "non-homologous end-joining" tamir mekanizmasında rol oynayan "rekombinasyonu aktive eden gen 1" (RAG1) ve "rekombinasyonu aktive eden gen 2" (RAG2) aracılığı ile DNA'nın her iki ipliğinde de kırıklar meydana gelir (Martini FH, vd 2012) . Bu keşif, 1987 yılında Susumu Tonegawa'ya Fizyoloji alanında Nobel Ödülü kazandırmıştır.



Şekil 2.4 B hücre yüzey reseptörü (Martini FH vd 2012)

İnsanlarda *Ig* gen yeniden düzenlenmeleri primer olarak fetal karaciğerde ve erişkinlerde kemik iliğinde gerçekleşir. Kemik iliğinde her gün on milyarlarca B-hücre

oluşurken, bu hücrelerin sadece yarısı yaşamlarına devam edebilmektedir. Bu hücreler, yeniden düzenlemeler sonucunda proteine dönüşebilen H ve L zincirlerinin V bölge genlerine sahip hücrelerdir. Diğer hücreler apoptozla elimine edilmektedirler (Rajewsky K 1996). B-hücre üzerinde reseptörleri eksprese olmaya başladığında, hücreler artık olgun naif B hücrelerdir ve kemik iliğinden ayrılırlararak periferel lenfoid dokulara geçerler. Son yıllarda yapılan çalışmalar, periferel dokulardaki (dalak ve lenf nodülü) olgun B hücrelerinin aktive olduktan sonra da (ya da antijen varlığında), Ig genlerinde yeniden düzenlenmelerin gerçekleştiğini göstermektedir. Ancak burada “sınıf-switch rekombinasyon” olarak adlandırılan farklı bir mekanizma rol oynamaktadır (Şekil 5) (Diaz M ve Daly J 2009).



Şekil 2.5 Immunglobulin gen yeniden düzenlenmeleri. (a) Kemik iliğindeki gelişimleri sırasında, B-hücre reseptörlerini oluşturan Ig genlerinin V, D ve J segmentlerinin rekombinasyonu. Eğer B-hücre yüzeyindeki Ig reseptörü kendi (self) antijenine yanıt oluşturursa, bu hücrede otoreaktif olmayan Ig oluşturmak amacı ile ayrıca hafif-zincir-gen rekombinasyonları gerçekleşir. (b) Periferel lenfoid dokularda olgun B-hücre aktivasyonu sonrası gerçekleşen sınıf-switch rekombinasyon. Bu rekombinasyonda, farklı bir antikor sınıfı oluşturmak amacı ile μ ekzonu diğer ekzonlarla yer değiştirir. Somatik hipermutasyonlar da benzer sonuçlara neden olur ve bu her iki mekanizma aktivasyon-indüklü deaminaz (AID) enzimini yardımı ile gerçekleşir (Diaz M ve Daly J 2009).

2.3.2. B hücre gelişimi ve farklılaşması

B-hücre gelişimi demek, B-hücrelerin Ig yapısında (monomerik IgM ve IgD) kendine özgü reseptörlerini hücre yüzeyinde eksprese etmeleri demektir. B hücre gelişimde gözlenen farklılaşma süreçleri temel olarak 4 basamakta incelenebilir:

1. Basamak: Kemik iliğinde B-hücrelerin oluşumu,
2. Basamak: Kemik iliğinde self-reaktif B-hücrelerin eliminasyonu,
3. Basamak: Sekonder lenfoid dokularda B- hücrelerin yabancı antijenlerle aktivasyonu, ve
4. Basamak: B-hücrelerin sekonder lenfoid dokularda antikor-salgılayan plazma hücrelerine ve anı B- hücrelerine farklılaşmaları (Kenneth M. vd 2008).

B-hücre gelişiminin her bir basamağında Ig gen yeniden düzenlenmeleri gerçekleşmektedir ve her bir basamaktaki bu yeniden düzenlenmeler, hücrenin bir sonraki basamağa ilerlemesi için gerekli olan sinyalleri kodlarlar.

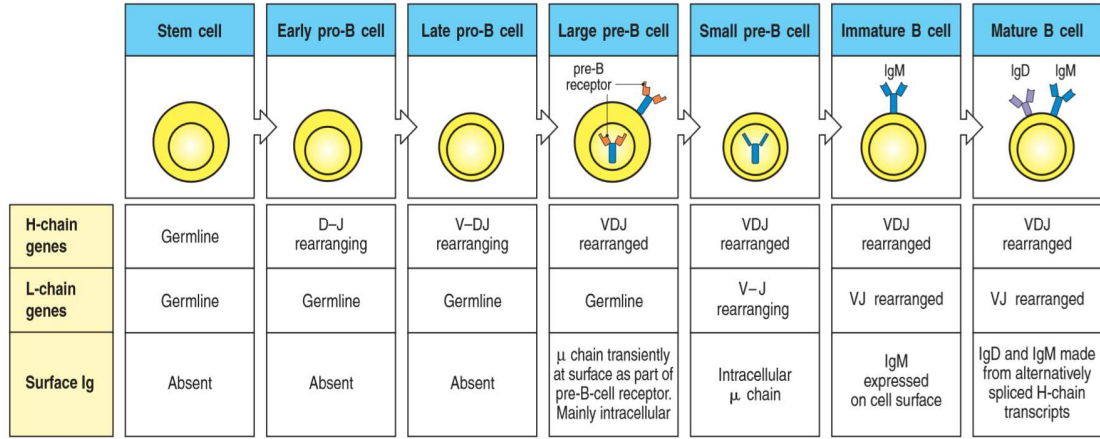
T hücreler ve doğal öldürücü (NK) hücreler gibi B-hücreler de ortak lenfoid progenitor hücrelerden köken alırlar ve oluşan ilk hücreler Ig gen yeniden düzenlenmelerinin başladığı pro-B-hücreleridir. B-hücre gelişiminin bu en erken evresi farklı transkripsiyon faktörleri ve büyüme faktör reseptörlerinin kontrolü altındadır. Özellikle B-hücre hattına-spesifik transkripsiyon faktörü olan E2A faktörü ve erken B-hücre faktörü (EBF) ile uyarımlar büyük önem taşımaktadır. Bu iki faktör, pro-B- hücre durumunu belirleyen proteinlerin ekspresyonunu yönlendirirler.

B-hücre gelişimleri boyunca kemik iliğinde yer değiştirirler ve sürekli kemik dokunun stromal hücreleri ile etkileşim içindedirler. B-hücre gelişim evreleri bir düzen içindedir ve bu düzen sırası ile erken pro-B-hücreler, geç pro-B-hücreler, küçük pre-B-hücreler ve olgun B-hücrelerdir. Her bir evrede sadece bir gen lokusunda yeniden düzenlenme meydana gelir. B-hücrelerin farklılaşma sürecinde ilk yeniden düzenlenmenin meydana geldiği bölge, Ig H zincir lokusudur. Bu değişim eksprese olduğunda, pre-B-hücre reseptörü oluşmuştur ve bu reseptör hücrede bir sonraki değişimi başlatacak sinyal anlamına gelmektedir. Bu sinyal, Ig L zincirinde yeniden düzenlenmeleri başlatır. Erken pro-B-hücrelerinde E2A ve EBF transkripsiyon faktörleri, gen yeniden düzenlenmelerini sağlayan birçok anahtar proteinin

ekspresyonunu uyarırlar. En önemli proteinler, V(D)J rekombinazın komponentleri olan RAG1 ve RAG2 proteinleridir. Bu nedenle E2A ve EBF, ağır zincir lokusunda V(D)J rekombinasyonunu başlatır. Bu faktörler aynı zamanda Pax-5 (B-hücre aktivatör proteini olarak da bilinen bir proteinin izoformudur) olarak adlandırılan bir başka transkripsiyon faktörünü de uyarırlar. Bu transkripsiyon faktörünün hedef genleri arasında CD19 (B-hücre ko-reseptör komponenti) ve $Ig\alpha$ (hem pre-B-hücre hem de B-hücre reseptörünün sinyal iletim komponenti) genleri yer almaktadır. Pax-5 yokluğunda, pro-B-hücreleri B-hücre gelişiminin diğer evrelerine ilerlemez.

$Ig H$ zincir lokusundaki yeniden düzenlenmeler, D ile J_H birleşmesi ile pro-B-hücrelerde başlar (Şekil 2.6). Tipik olarak bu değişim H-zincir lokusunun her iki allelinde de meydana gelir ve sonuçta geç pro-B-hücreleri oluşur. Tam bir $Ig H$ zinciri oluşturmak için, geç pro-B-hücreleri bundan sonra V_H segmenti ve DJ_H dizilimi arasında ikinci bir yeniden düzenlenme geçirir. D- J_H yeniden düzenlenmenin aksine, V_H - DJ_H yeniden düzenlenmesi sadece tek bir kromozomda meydana gelir. Başarılı bir ikinci yeniden düzenlenme sonucunda, μ ağır zinciri oluşur ve artık hücreler, pre-B-hücreleridir (Şekil 2.6). Bir μ ağır zincirini oluşturamayan pro-B hücreleri elimine edilir ki, bu evrede elimine edilen pro-B-hücrelerinin oranı %45'tir. Pro-B-hücreleri terminal deoksinükleotidil transferaz (dTd) enzimini eksprese eder ve bu enzim yeniden düzenlenen gen segmentleri arasındaki bağlantı bölgelerine "nontemplated" nükleotidleri (N-nükleotidler) ekleyerek B-hücre antijen-repertuarını genişletir. Yetişkin bireylerde H zincir gen yeniden düzenlenmeleri sırasında pro-B hücrelerinde eksprese edilen bu enzimin düzeyi, pre-B-hücrelerde L zincir gen yeniden düzenlenmeleri sırasında azalır. Bu da bize, H zincir genlerinin hemen hemen tüm V-D ve D-J birleşme bölgelerinde ve L zincir birleşme bölgelerinin yaklaşık $\frac{1}{4}$ 'ünde N-nükleotidlerinin varlığını açıklar.

V(D)J rekombinasyonunun bu gevşek doğası, iki ucu keskin bıçak gibidir. Bir taraftan bu rekombinasyonun ürünleri antikor repertuarında farklılıkları arttırırken, diğer taraftan başarısız yeniden düzenlenmelere de neden olur. Bu nedenle, pro-B-hücreleri fonksiyonel bir H zincir oluşup oluşmadığını test etmek zorundadırlar. Bu test, L zincirdeki düzenlenmeden önce yapılır. Pro-B-hücreleri iki sabit vekil (surrogate) protein üretirler. Bu proteinler L zincirle yapısal benzerlik gösterirler ve pre-B-hücre reseptörünü (pre-BCR) oluşturmak üzere μ zinciri ile eşleşebilirler. Oluşan bu pre-BCR,



Şekil 2.6 B lenfosit gelişimi. (Kenneth M vd 2008)

pro-B- hücre sine prodüktif bir yeniden düzenlenmenin yapıldığı sinyali gönderir. $\lambda 5$ ve VpreB genleri tarafından kodlanan $Ig\alpha$ (CD79 α) ve $Ig\beta$ (CD79 β) vekil proteinleri, hücre yüzeyinde bulunan hem pre-B-hücre reseptör hem de B-hücre reseptör komplekslerinin önemli komponentleridir. $Ig\alpha$ ve $Ig\beta$, bu iki reseptörden aldıkları sinyalleri hücre içine iletirler ki bu aşamada alınan sinyal, proteinlerin sitoplazmik bölgeleri aracılığı ile intraselüler tirozin kinazları uyarır. Bu iki vekil protein, pro-B-hücre sinden başlayarak hücre ölene kadar ya da antikor salan plazma hücre sine farklılaşana kadar eksprese edilir (Kenneth M. vd 2008).

Kemik iliğinde olgunlaşan B-hücreler daha sonra dolaşıma katılırlar ve periferik lenfoid organlara göç ederler. Kemik iliği dışındaki B-hücreler morfolojik olarak birbirlerine benzemekle birlikte hücre yüzey fenotipleri, anatomik lokalizasyonları ve fonksiyonel özellikleri açısından farklılıklar gösterirler. Barsakla-ilişki lenfoid doku (GALT) dışında B- hücrelerinin büyük çoğunluğu, dalak ve lenf nodüllerinin lenfoid follikülleri içinde yer alırlar (Kenneth M. vd 2008)

2.4. Hematopoetik neoplaziler

Kanser orijin aldığı hücre tipine göre iki ana kategoride gruplandırılabilir: Epitel hücrelerden köken alanlar (karsinomlar) ve mezenkimal dokulardan köken alanlar (lösemiler, lenfomalar, ve myelomlar). Lösemiler kemik iliği ve periferal kanda anormal beyaz kan hücrelerinin birikimi ile karakterize bir hastalıktır. Multiple myelomlar (kısaca myelomalar olarak da adlandırılmaktadır) ise kemik iliğindeki plazma

hücrelerinden köken alır ve tek tip immunglobulin molekülünün (bir paraproteindir ve M-protein olarak adlandırılır) üretimi ile karakterize bir hastalıktır.

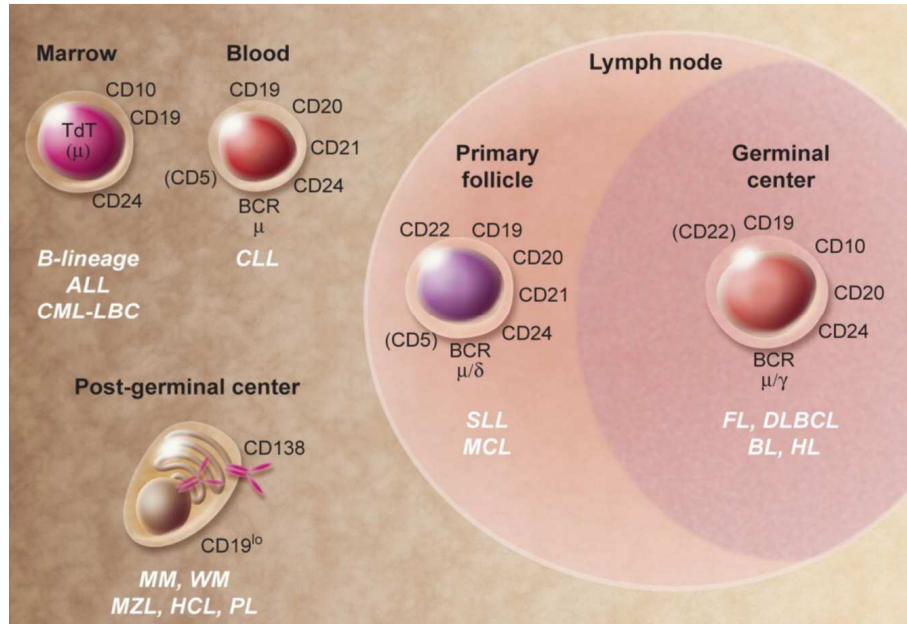
Malign lenfomalar lenf nodülleri veya diğer lenfoid dokulardaki transforme lenfoid hücrelerden orijin alırlar ve heterojen bir grubu kapsamaktadırlar. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) bu heterojen grubu B hücre neoplazileri, T ve NK-hücre neoplazileri ve Hodgkin lenfomalar olmak üzere 3 ana kategoride sınıflandırmaktadır (Swerdlow vd 2008) (Tablo 1). B- ve T-hücre neoplazileri klinik seyirlerine göre indolent (yavaş seyirli), agresif (hızlı seyirli) ve çok agresif olmak üzere 3 kategoride değerlendirilebilir ve bu kategoriler özellikle klinik açıdan önemlidir. Genelde, yavaş progressif klinik seyirle karakterize indolent lenfomalar tedavi edilemezken, agresif ve çok agresif lenfomalar çok daha hızlı bir seyir izlerler ve modern kemoterapi ile tedavi edilebilirler.

Tablo 1. WHO sınıflandırmasına göre lenfoid neoplazilerin ana kategorileri ve alt tipleri

Kategori	Alt tip örnekler
B-hücre neoplazileri	Prekürsör B hücre neoplazileri Lenfoblastik lösemi/lenfoma Olgun B-hücre neoplazileri Foliküler lenfoma Diffüz büyük B-hücreli lenfoma Kronik lenfositik lösemi Mantle hücreli lenfoma
T / NK hücre neoplazileri	Prekürsör T-hücre neoplazileri Lenfoblastik lösemi/lenfoma Blastik NK-hücreli lenfoma Olgun T-hücre neoplazileri Periferik T-hücreli lenfoma Anaplastik büyük hücreli lenfoma Mikozis fungoides
Hodgkin lenfoma	Nodüler lenfosit predominant Klasik Nodüler skleroz Karışık selülarite Lenfosit zengin Lenfosit tükenmiş

2.5. GC'ler ve B hücre lenfomaları

Daha önce de belirttiği üzere GC'ler, B-hücrelerinin yüksek afiniteli antikorları oluşturmak üzere farklı genetik süreçler geçirdikleri yerlerdir. Yabancı maddelere karşı oluşan immun yanıt sırasında organizma lehine fonksiyon yapan GC yanıtı aynı zamanda bir risk de taşır. B-hücre lenfomaları, lenfatik sistemdeki B-hücrelerini etkileyen kanser türüdür. Bu lenfomalar, B-hücresinin nasıl etkilendiğine bağlı olarak sınıflandırılırlar (Şekil 2.7, Tablo 2.2) (LeBien TW ve Tedder TF. 2008, Steven H. Vd 2008)



Şekil 2.7 İnsan B-hücre malignansileri. Normal B-hücre gelişimi sırasında eksprese olan hücre yüzey, sitoplazmik ve nüklear belirteçler genellikle malignansilerde de eksprese olurlar. Parantez içindeki moleküller, ekspresyonlarında farklılıklar olan molekülleri göstermektedir. ALL, akut lenfoblastik lösemi; BL, Burkitt lenfoma; CLL, kronik lenfositik lösemi; CML-LBC, kronik myelositik lösemi-lenfoid blast krizi, DLBCL, diffüz büyük B-hücreli lenfoma; FL, folliküler lenfoma; HCL, saçaklı hücreli lösemi, HL, Hodgkin lenfoma; MCL, mantle hücreli lenfoma; MM, multiple myeloma, MZL, marjinal zon lenfoması; PL, plazmablastik lenfoma; SLL, küçük lenfositik lenfoma; ve WM, Waldenström makroglobulinemi (LeBien TW ve Tedder TF 2008)

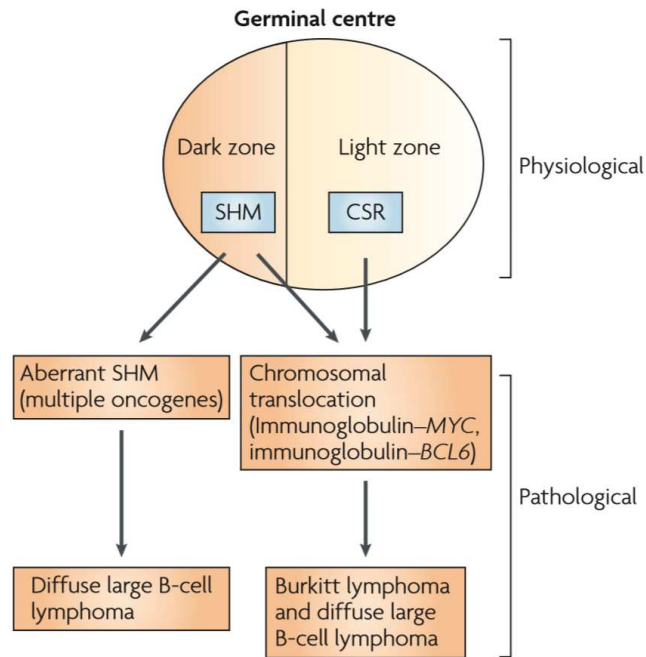
Tablo 2.2. Olgun B-hücre neoplazileri (WHO, 2008)

Kronik Lenfositik Lösemi/Küçük Lenfositik Lenfoma
B-hücreli prolenfositik lösemi
Dalak marjinal zon lenfoma
Saçaklı hücreli lösemi
<i>Splenik B-hücre lenfoma / lösemi, sınıflandırılmayan</i>
<i>Splenik diffüz kırmızı pulpa küçük B-hücreli lenfoma</i>
<i>Saçaklı hücreli lösemi-varyant</i>
Lenfoplazmasitik lenfoma
Waldenström makroglobulinemi
Ağır zincir hastalıkları
Alfa ağır zincir hastalığı
Gama ağır zincir hastalığı
Mu ağır zincir hastalığı
Plazma hücreli myeloma
Kemik soliter plazmasitomu
Ekstraosseous plazmasitom
Mukoza ilişkili lenfoid dokunun ektranodal marjinal zon lenfoması (MALT lenfoma)
Nodal marjinal zon lenfoması
<i>Pediyatrik nodal marjinal zon lenfoması</i>
Foliküler Lenfoma
<i>Pediyatrik Foliküler Lenfoma</i>
Primer kutanöz folikül merkezli lenfoma
Mantle hücreli lenfoma
Diffüz büyük B-hücreli lenfoma (DBBHL), NOS (not otherwise specified)
T hücre / histiyosit zengin büyük B-hücreli lenfoma
<i>Merkezi sinir sisteminin primer DBBHL'sı</i>
<i>Primer kutanöz DBBHL, bacak tipi</i>
<i>Yaşlılarda Epstein-Barr virus (EBV) pozitif DBBHL</i>
Kronik inflamasyonla ilişkili DLBCL
Lenfomatoid granülomatozis
Primer mediastinal (timik) büyük B-hücreli lenfoma
İntravasküler büyük B- hücreli lenfoma

Devamı arka sayfada

	ALK pozitif büyük B- hücreli lenfoma
	Plazmablastik lenfoma
N	Primer efüzyon lenfoma
a	HHV8 ile ilişkili çok merkezli Castleman hastalığından kaynaklanan Büyük B lenfoma
d	Burkitt lenfoma
i	Diffüz büyük B-hücreli lenfoma ve Burkitt lenfoma arasında özellikler gösteren B-hücreli lenfoma, sınıflandırılmamaktadır
r	Diffüz büyük B-hücreli lenfoma ve klasik Hodgkin lenfoma arasında özellikler gösteren B-hücreli lenfoma, sınıflandırılmamaktadır

Nadir görülen lenfoblastik ve mantle-hücre lenfoma alt tipleri dışında, tüm B-hücre Hodgkin-dışı lenfoma (Non-Hodgkin Lymphoma, NHL)'larda, *IgV* genlerinde somatik mutasyonlar (hipermutasyona uğramış *IgV* genleri) gözlenir ve bu da bize bu lenfomaların GC içinde bloklanan veya GC'den geçen B-hücrelerden köken aldıklarını gösterir (Küppers, vd 1999, Stevenson, F. vd 1998) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8 GM B-hücrelerinde DNA lezyonları ve fonksiyonel sonuçları. Sınıf-switch rekombinasyon (CSR) ve somatik hipermutasyon mekanizmalarındaki hatalar, kromozomal translokasyonlarla sonuçlanabilen serbest DNA uçlarının oluşumuna neden olabilirler. Bu resimde Burkitt lenfoma ve DBBHL'da karakteristik olan *Ig-MYC* ve *Ig-BCL6* translokasyonları yer almaktadır. Aynı zamanda birçok onkogenin 5'-regülatör bölgelerinde veya kodlama yapan bölgelerinde kendini gösteren somatik hipermutasyonlar da DBBHL patogeneziinde yer almaktadır (Klein U ve Dala-Favera R 2008).

Temel olarak B-hücre NHL'ların alt tiplerinin genomları iki tip genetik lezyonla karakterizedir: Kromozomal translokasyonlar ve aşırı somatik hipermutasyonlar. Bu lezyonlar Ig gen yeniden düzenlenme mekanizmasındaki hatalardan veya malformasyonlardan kaynaklanmaktadır (Küppers, R. & Dalla-Favera 2001, Küppers 2005). Son yıllarda yapılan bir çalışmada sınıf-switch rekombinasyonların regülasyonunda gözlenen anormalliklerin de bu alt tiplerde gözlenen genetik değişimlerden biri olduğu hatta bu değişimin kromozomal translokasyonların meydana gelmesinden sorumlu olabileceği öne sürülmüştür (Lenz G. vd 2007). Somatik hipermutasyonlar ve sınıf-switch rekombinasyonlarla ilişkili translokasyonlardan dikkati çeken istisnalar folliküler lenfomada Ig ve Bcl-2 genlerini içeren t(14;18) translokasyonu ve endemik-tip Burkitt lenfomada Ig ve MYC genlerini içeren t(14;18) translokasyonudur. Somatik hipermutasyonlar GC dışında da meydana gelebilir ve bu durumda ektrafoliküler B hücreleri bazı lenfoma alt tiplerinin oluşmasından sorumlu hücreler olabilir (Weller S. vd 2004).

Aşırı somatik hipermutasyonlar, çoğunlukla B-hücre NHL alt tipi olan Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma (DBBHL) ile ilişkilidir. Bu aşırı mutasyonlar MYC ve PIM1 gibi proto-onkogenleri içeren birçok genin 5' ucunda yer alan (transkripsiyon başlama bölgesinin 2 kb downstream'inde) nükleotid değişimlerini içerir ve bu değişimler DBBHL'lı vakaların yaklaşık %50'sinde gözlenir (Pasqualucci L. vd 2001). Aşırı somatik hipermutasyonların, Ig gen bölgeleri dışındaki bölgelerde, somatik hipermutasyon mekanizmasının aşırı aktivitesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Aşırı somatik hipermutasyonlar, proto-onkogenlerin 5' regülatör bölgelerinde meydana gelen mutasyonları da içerirler ve sonuçta proto-onkogenlerin ekspresyonlarında problemlere neden olabilirler (Pasqualucci L vd 2003). Sadece 5' regülatör bölgelerde değil, genin kodlayan bölgelerindeki mutasyonlar da, ilgili gen ürününün doğru işlevini etkileyen aminoasit değişimlerine neden olabilirler. Buna en iyi örnek MYC geninde meydana gelen aşırı somatik hipermutasyonlardır ve bu mutasyonlardan bazıları genin onkogenik potansiyelini aktive eder. Bir başka açıdan somatik hipermutasyonlar, bu tür onkogenlerde DNA kırıklarının oluşmasına neden olarak kromozomal translokasyonların oluşumuna yardımcı olabilir. Dolayısıyla, yukarıda açıklanan tüm mekanizmalar, aşırı somatik hipermutasyonun DBBHL ile ilişkili lenfomagenezde yer alan en önemli komponentlerden biri olduğunu açıkça göstermektedir.

Somatik hipermutasyonlar ve sınıf-switch rekombinasyonda aktivasyon indüklü deaminaz (AID) enziminin önemli bir rolü olduğu ve bu enzimin kromozomal translokasyonların ve somatik hipermutasyonların oluşuna yardım ederek DBBHL patogenezi katıldığı gösterilmiştir. *In vivo* çalışmalarda, sürekli bu enzimi eksprese eden farelerde farklı hücresel orijinli tümörlerin geliştiği belirlenmiştir. B-hücre kökenli Hodgkin dışı lenfomalarda AID geninde mutasyonların gözlenmemesi, bu genin lenfomagenez sırasında meydana gelen somatik hipermutasyonlar ve sınıf-switch rekombinasyonlarındaki anormalliklerden direkt olarak sorumlu tutulamayacağını, bunun aksine bu genin genomda hedeflediği diğer mekanizmalarda değişimlere neden olarak lenfomageneze katıldıklarını düşündürmektedir (Okazaki IM vd 2003).

2.5.1. B-hücre lenfomagenezindeki genetik değişimlerin fonksiyonel sonuçları

B-hücre NHL'larda ilişkili kromozomal translokasyonlar tipik olarak proto-onkogenlerin ekspresyonlarında düzensizliklere neden olurlar. Dolayısıyla, gen füzyonuna neden olan kromozomal translokasyonlar birbirlerinden farklı olabilirler ve bu da lenfomalarda gözlenen bulguların birbirlerinden farklı olmasından sorumludur. B-hücre NHL ile ilişkili kromozomal translokasyonların ortak noktası, GC B-hücre gelişimini regüle eden genlerin transkripsiyonal bozukluğu ya da normalde eksprese olmayan genlerin olgun B-hücrelerin belirli bir gelişimsel sürecindeki ektopik ekspresyonudur (Kelin U ve Dalla-Favera R 2008).

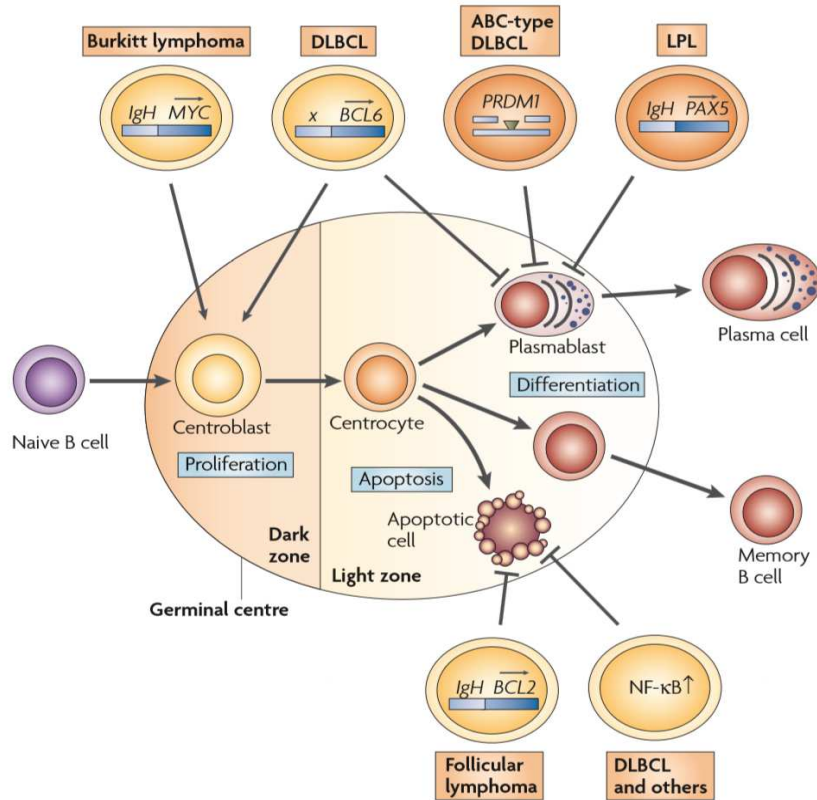
Foliküler lenfoma, IgH lokusu ve Bcl-2 proto-onkogenini içeren translokasyonlarla karakterize bir B-hücre NHL alt grubudur. Bu lenfomada tümör hücreleri folliküler büyüme paterni gösterirler ve tümör hücrelerinin GC sentroblastlarından köken aldıkları düşünülmektedir (Küppers R vd 1999, Stevenson F. vd 1998). Sentroblastlar normalde Bcl-2 eksprese etmezler ve tümör hücrelerinde Bcl-2'nin ektopik ekspresyonunun lenfomagenezi uyardığı düşünülmektedir.

Bcl-2'nin aksine, GC B-hücrelerinde Bcl-6 eksprese olur. Sıklıkla DBBHL ve daha az sıklıkla folliküler lenfomada gözlenen ve Bcl-6'yı içeren kromozomal translokasyonlar, Bcl-6'nın sürekli ve aşırı eksprese olmasına neden olurlar. Bcl-6'nın bu onkogenik rolü fare modellerinde de gösterilmiştir (Cattoretti vd 2005). Bcl-6 ekspresyonundaki regülasyonun bozulması, sentroblastların tümör-hücre prekürsörlerine transkripsiyonal programlanmasına yardımcı olacak şekilde post GC farklılaşma sürecini bloke eder. Aynı zamanda Bcl-6'nın sürekli eksprese olması spesifik pro-

proliferatif ve DNA hasarına toleranslı sentroblastik fenotipin korunmasına (devamlılığına) yardım eder.

Lenfoplazmositik lenfomada PAX5 ve IgH lokuslarını içeren kromozomal translokasyonlar, post-GC farklılaşmasında blokaja neden olabilirler. B-hücre fenotipinin korunmasından (devamlılığından) sorumlu olan PAX5'in sürekli eksprese edilmesi, B-hücre programlanmasının silinmesini önleyebilir ve sonuçta B hücrelerinin plazma hücrelerine terminal farklılaşması bloke edilir.

IgH zincir yada L zincir lokusuna MYC translokasyonu, Burkitt Lenfoma olgularının tümünde (%100) ve DBBHL olgularının %10'unda gözlenen bir değişimdir. Bu lenfoma türleri GC B-hücrelerinin onkogenik transformasyonundan köken alırlar ve dolayısıyla tümör hücrelerinin gen ekspresyon profilleri GC B-hücreleriyle yakın ilişkilidir. MYC ekspresyonundaki bu değişimin onkogenik sonucu; hücre büyümesini kontrol eden genlerin transkripsiyonal regülasyonunda değişimler ve en nihayetinde de genomik instabilitedir. Özetle, GC B-hücrelerinde MYC'in ektopik ekspresyonu ya direkt olarak ya da indirekt olarak ek genetik değişimlere neden olarak lenfomageneze katılır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9 B-hücre lenfomagenezini uyaran moleküler mekanizmalar (Kelin U ve Dalla-Favera R 2008)

DBBHL'nin bir alt tipi olan Aktif B-hücre (ABC) DBBHL'da, BLIMP1 (PRDM1)'i kodlayan genin inaktivasyonu (LOH veya epigenetik olarak) B-hücrelerinin plazma hücrelerine post-GC farklılaşmasını bloke ederek tümör gelişimine katkıda bulunabilirler (Pasqualucci vd 2006). Bu durum, ABC-DBBHL'de Bcl-6 regülasyonunu bozan mekanizmalara ek olarak gözlenen özel bir durumdur ve bu da bize post-GC farklılaşmadaki bir blokajın alternatif genetik değişimlere neden olabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak, B-hücrelerinde IgL zincirinin transkripsiyonunu aktive eden bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B'nin sinyal iletim yolağı aktivitesi DBBHL'nin patogeneğinde yer alsa da, bugüne kadar bu anormal aktivasyonu açıklayabilen herhangi bir spesifik genetik değişim tanımlanmamıştır (Davis R. E. vd 2001). Bu nedenle, normalde sentroblastlarda sessiz olan NF- κ B sinyal iletim yolağının, B-hücrelerine ektopik hayatta kalma sinyalini sağlayıp sağlamadığı henüz netlik kazanmamıştır. Aynı zamanda bu yolağın tümör-hücre prekürsörü olan sentroblastın özel bir gelişim evresinde görülen bir değişimi yansıtmayı yansıtmadığı da bilinmemektedir (Shaffer A. L. vd 2001, Basso K. vd 2004).

2.6. Diffüz Büyük B-hücreli lenfoma

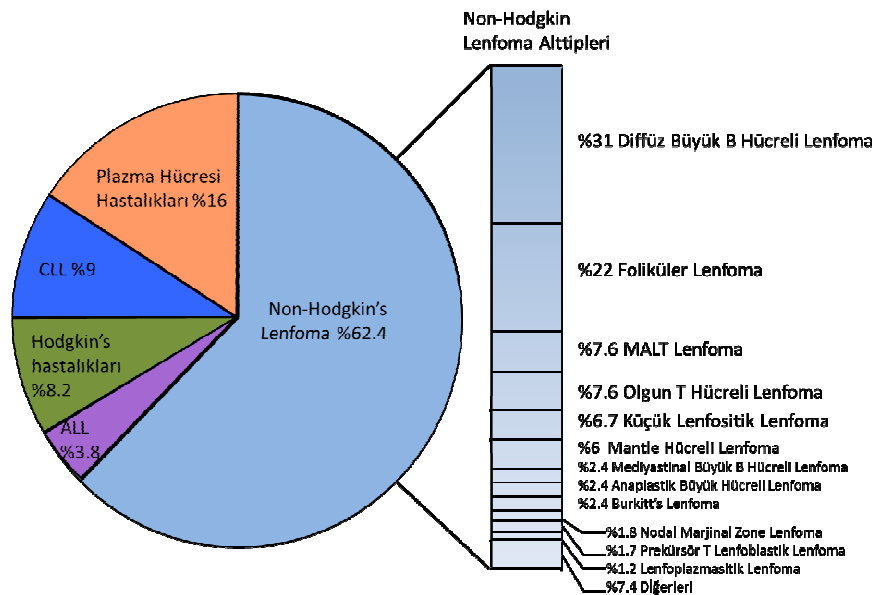
2.6.1. Epidemiyoloji

Kanser, hemen hemen tüm dünya ülkelerinde ölüm nedenleri arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer almaktadır (Siegel R vd 2012). WHO 2008 yılı verilerine göre, Dünya genelinde %13'lük bir oranla, 7.6 milyon kişi kanser nedeniyle hayatını kaybetmiştir (WEB_2).

NHL, Hodgkin lenfomalardan 6 kat daha yaygın görülen bir patolojidir ve tüm insan kanserlerinin %4'ünü oluşturmaktadır (Steven H vd 2008). Erkeklerde kadınlara oranla daha sık görülür ve beyaz ırkta görülme insidansı diğer ırklara göre daha yüksektir. Hodgkin lenfomaların insidansı yıllara göre değişiklik göstermemesine karşın, NHL'de insidansın her yıl arttığı bilinmektedir. Amerikan Kanser Derneği 2012 yılı verilerine göre NHL tanısı koyulan tahmini vaka sayısı 70.130'dur ve bu hastalıktan ölen vakaların sayısı ise yaklaşık 18.940'tır. WHO 2008 Türkiye verilerine bakıldığında; 2.123 kişi NHL nedeniyle hayatını kaybetmiştir. 2012 Dünya Kanser Sağkalım İstatistiklerine göre tüm NHL olgularının 5 yıllık sağkalım oranı %67.3'tür. NHL'nın

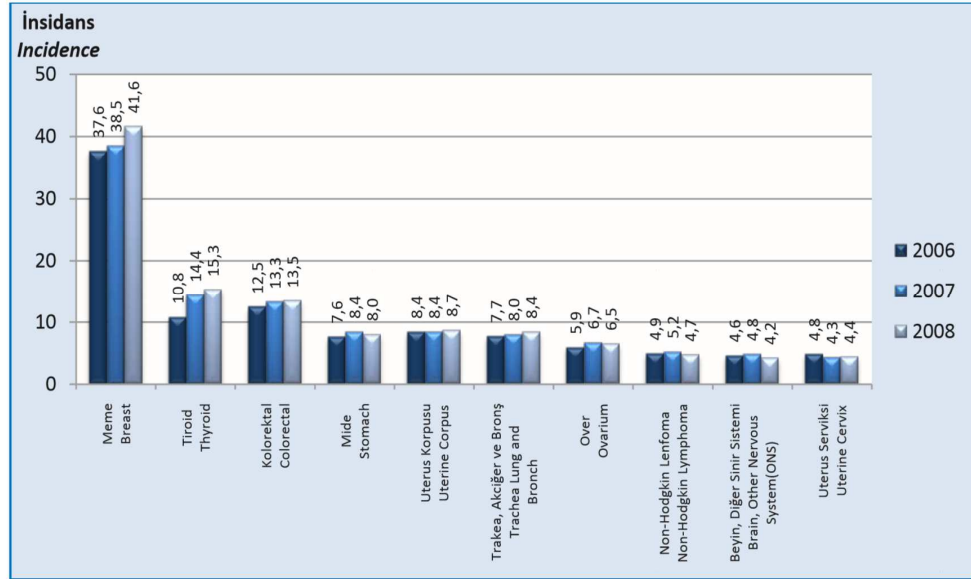
alt sınıfları için 5 yıllık sağkalım oranları: Foliküler Lenfoma'da %84.2; DBBHL'da %59.1; Burkitt Lenfoma'da %54.5 olarak belirlenmiştir (Siegel R vd 2012).

NHL'lerin en yaygın formu olan DBBHL, yeni tanı alan NHL'ların yaklaşık %30'una karşılık gelmektedir (Şekil 2.10). DBBHL'nin ilk tanısı çok geniş yaş aralığında koyulsa da, ortalama tanı koyma yaşı 70'tir. Görülme sıklığı erkeklerde biraz daha yüksektir ve Erkek/Kadın görülme oranı 1.2'dir. DBBHL'nin insidans oranları coğrafi farklılıklar göstermektedir ve en yüksek insidans oranlarına Amerika, Avustralya ve Avrupa ülkelerinde rastanırken, bu oran Asya'da en düşük değerlere sahiptir. 1970'li yıllarla karşılaştırıldığında; cinsiyet, ırk ve yaş (çok genç yaş grubu hariç)-bağımsız olarak insidansın her geçen yıl arttığı bilinmektedir (Fisher SG ve Fisher RI, 2004). Amerika'da 1990'lı yılların sonunda 8.07-8.98 vaka / 100.000 populasyon olan DBBHL insidansının 1992-2006 yılları arasında yıllık yaklaşık %1'lik artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu artan insidansla ilişkili önemli faktörler arasında kanser raporlarının düzenli tutulması, çok daha duyarlı tanı yöntemlerinin kullanılması (özellikle borderline lezyonlar için), lenfoproliferatif hastalıkların sınıflandırılmasındaki değişiklikler ve AIDS'le-ilişkili DBBHL sıklığındaki artışlar yer almaktadır (Flowers CR vd 2010).

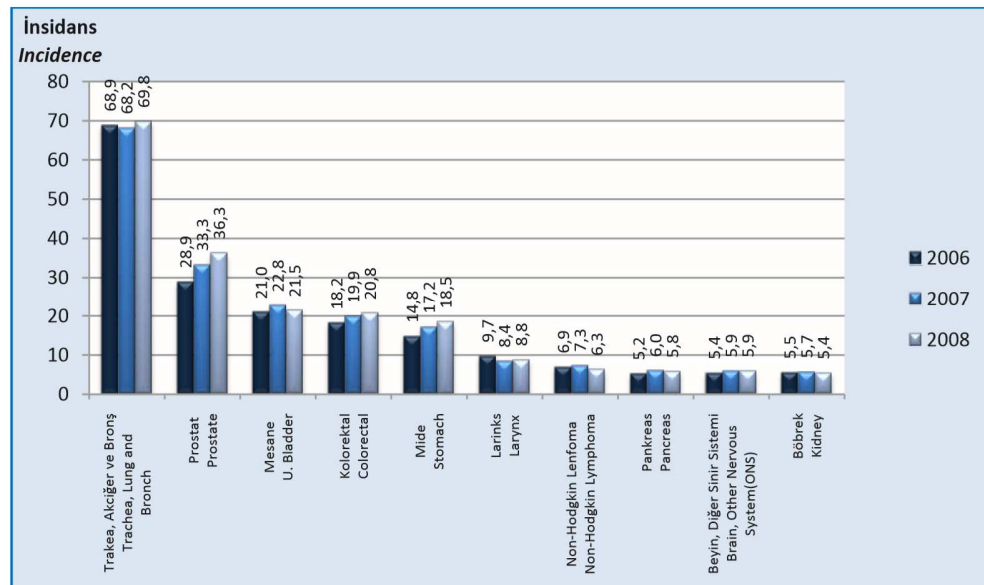


Şekil 2.10 Farklı lenfoid malignansilerin relatif görülme sıklıkları (Harrison's Principles of Internal Medicine'dan alınmış ve Türkçe'ye çevrilmiştir)

Türkiye’de 2006-2008 yıllarına ait Sağlık Bakanlığı kanser istatistik verilerine göre, NHL’lar kadınlarda en sık görülen 8.kanser türü iken, erkeklerde 7. sırada yer almaktadır (Şekil 2.11 ve 2.12) (WEB-3). Diğer Batı ülkelerinde belirtilen insidans artışının aksine, ülkemizde hem kadınlarda hem de erkeklerde önemli bir insidans artışı gözlenmemektedir.



Şekil 2.11 Kadınlarda En Sık Görülen 10 Kanser Türünün İnsidansı (100.000 bireyde).



Şekil 2.12 Erkeklerde En Sık Görülen 10 Kanser Türünün İnsidansı (100.000 bireyde).

2.6.2. Risk Faktörleri

Yetişkin bireylerde görülen tüm lenfomaların yaklaşık 1/3'ünü DBBHL oluşturmaktadır. Oldukça agresif bir seyir izler ve tedavi almayan hastalar ortalama 1 yıldan daha az yaşam süresine sahiptirler (Fisher SG ve Fisher RI 2004). Olguların büyük bir çoğunluğunda etyoloji tam olarak bilinmemektedir, ancak genetik faktörlerin, komorbid (diğer bir patolojiyle eş zamanlı görülen) hastalıkların veya bu hastalıklarda uygulanan tedavilerin (özellikle immunbaskılayıcı ajan kullanımı) ve ultraviyole radyasyon, pestisitler, saç boyaları ve diyet gibi çevresel faktörlerin hastalık riskini arttırdığı bilinmektedir.

Genetik faktörler

DBBHL gibi diğer birçok lenfomada etyoloji net olarak bilinmemekle birlikte, NHL'larda en iyi bilinen risk faktörü ciddi immunsupresyondur (Morton LM vd 2009). Lenfomagenezin genetiğini araştıran vaka-kontrol çalışmaları inflamatuvar yollar, lenfoid hücre döngüsü, apoptoz ve gelişim gibi önemli hücresel yollara odaklanmıştır. Her ne kadar DBBHL için tek bir duyarlılık geni tanımlenemese de, DBBHL etyolojisinin altında yatan genetik predispozisyonla ilgili önemli veriler elde edilmiştir. Bu veriler sırası ile 1) DBBHL riski, hematolojik malignensi aile öyküsü bulunan bireylerde artış göstermektedir, 2) DBBHL insidans oranı göçmen bireylerde sabittir ve kendi ülkelerindeki paterne sahiptir, ve 3) Lenfomalı bireylerde bazı genetik varyasyonlar belirlenmiştir (Flowers CR vd 2010). NHL epidemiyologlarının oluşturduğu uluslararası bir konsorsiyum olan "InterLymph" tarafından yapılan geniş kapsamlı vaka-kontrol çalışmasında, TNF- α (TNF-308G>A) ve IL-10 (IL10-3575T>A) genlerindeki allelik varyantlar ile DBBHL riski arasında önemli bir ilişki bulunmuştur (Rothman N vd 2006).

Komorbid hastalıklar

Viral infeksiyonlar ve immun sistemi baskılayan durumlarla (otoimmün hastalıklar, organ transplantları, primer veya kazanılmış immünyetmezlik gibi) immun sistemi baskılayan tedavilerin DBBHL riskini arttırdığı bilinmektedir. Özellikle Epstein-Barr virüsü (EBV), Kaposi sarcoma-ile ilişkili insan herpes virus 8 (HHV 8), hepatit C virusu (HCV), *Helicobacter pylori* ve *Chlamydia psittaci* gibi mikroorganizmalar tarafından

oluşturulan infeksiyonların hastalık riski ile önemli ilişkisi olduğu belirlenmiştir. Örneğin, immunoblastik ve primer merkezi sinir sistemi tipleri olarak adlandırılan DBBHL alt tiplerinin, EBV ile oldukça ilişkili olduğu gösterilmiştir (Fisher SG ve Fisher RI. 2006) Ancak infeksiyöz patojenlerin konak hücrelerde lenfomajenezi veya B-hücre proliferasyonuna neden olan antijenik uyarımı başlatan mutasyonlara neden olup olmadıkları ya da tümör gelişimini uyaran immunsupresyona neden olup olmadıkları henüz bilinmemektedir. Lenfoid malignensili 44.350 olgu ve kontrol olarak 122.531 bireyin dahil edildiği “SEER-Medicare Assessment of Hematopoietic Malignancy Risk Traits (SMAHRT)” çalışmasında, lenfoma alt tipleri ve otoimmün hastalıklar arasındaki ilişki araştırılmış ve DBBHL’da risk artışı ile romatoid artrit, Sjogren sendromu ve otoimmün hemolitik anemi arasında önemli bir ilişki saptanmıştır (Anderson LA vd 2009). Sonuç olarak DBBHL’da risk faktörleri multifaktöriyel görünmektedir.

Çevresel faktörler

DBBHL gelişiminin genetik ve çevresel risk faktörlerini içermesi nedeniyle, birçok vaka-kontrol çalışmaları bu iki faktörün etkileşimine odaklanmıştır. Amerika’da yapılan bir çalışmada, 10 yıllık bir periyotta endüstriyel tesislere yakın bölgelerde yaşayan bireyler incelenmiş ve bir kereste tesisinin yaklaşık 3 km çevresindeki yaşayan bireylerde DBBHL riskinin arttığı gözlenmiştir (De Roos AJ vd 2010). Amerika, Avrupa ve Avustralya’yı kapsayan bir başka çalışmada da güneş ışınlarına maruz kalmanın bir risk faktörü olabileceği belirlenmişse de, güneş ışınlarına uzun süre maruz kalmanın diğer hastalık için de risk olabileceği vurgulanmıştır (Krickler A vd 2008). Bunun yanısıra ultraviyole ışınlar, herbisitler, insektisitler ve oksidatif boya ürünlerinin lenfoma riskini arttırabildiği belirlenmişse de, DBBHL gelişimindeki etkileri henüz aydınlatılmış değildir (Flowers CR vd 2010).

2.6.3. Klinik prezantasyon

En yaygın görülen semptomlardan biri ağrısız lenf nodu büyümesidir. Ancak, hastaların %40’ı ektranodal (deri, gastrointestinal kanal, merkezi sinir sistemi, akciğer, genitoüriner kanal veya kemikler) prezantasyon ile kliniğe başvurmaktadırlar. Hastaların yaklaşık %15’inde kemik iliği tutulumu vardır ve 1/3’ünde de B semptomları (Ateş, istem dışı kilo kaybı ve gece terlemeleri) gözlenir. Ayrıca bu hastaların yaklaşık

½'si evre III/IV (Ann Arbor sistemine göre)'dür ve serumlarında laktat dehidrogenaz düzeyleri yüksektir (WEB_4). Hastalığın klinik prezantasyonunda bu kadar belirgin farklılıkların gözlenmesi, biyolojik alttıplerin yanısıra ırk, etnik ve coğrafik özelliklerinde bu farklılığın oluşmasında rol oynayabileceği düşündürmektedir. Bu amaçla planlanan çalışmalar, duyarlılıkla ilişkili tek nükleotid polimorfizmlerinin belirlenmesinin yanısıra gen-çevre etkileşimlerinin rolünü araştırmaya yönelik olmalıdır.

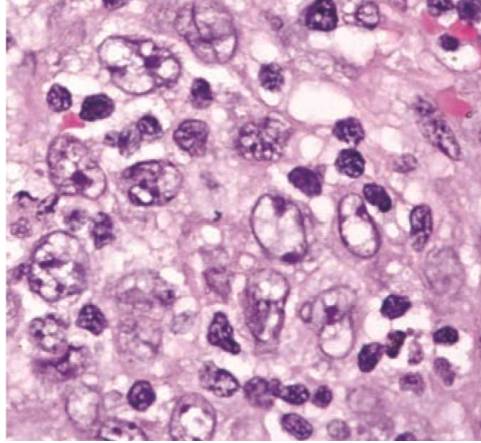
2.6.4. Tanı

DBBHL'de tanı cerrahi örnek/ekzisyonal lenf nodu veya ektranodal doku biyopsi örneklerinden hazırlanmış yeterli doku örneğini içeren formalinle-fikze doku örneklerinde koyulmalıdır. Acil tedaviye başlanması gereken hastalarda kor biyopsi materyalleri de değerlendirilebilir. Uygulanması zorunlu minimal immunohistokimyasal boyamalar CD45, CD20 ve CD3'tür. Her ne kadar gen ekspresyon profiline dayalı karakterizasyon henüz araştırma aşamasında olmakla birlikte taze doku örneklerinin saklanması ileri moleküler karakterizasyonların yapılabilmesi açısından önerilen bir yaklaşımdır. İster gen ekspresyon profiline ister immunohistokimyasal analiz sonuçlarına dayalı olsun, günümüzde DBBHL'da tanı koyulduktan sonra DBBHL'da alt tip ayırımı yapmak, henüz uygulanacak tedavinin seçiminde kullanılan bir parametre değildir (Tilly H vd 2012).

2.6.5. Sınıflandırma

DBBHL'nin karakteristik morfolojisi, lenf nodülünde transforme olan büyük lenfositlerin diffüz proliferasyonudur (Şekil 2.13). Bu lenfoid hücrelerin nükleus boyutları, normal lenfositlerin yaklaşık 2 katıdır. WHO, DBBHL'yi morfolojik farklılıklara ve immunofenotipik profillerine göre, farklı gruplara sınıflandırmıştır (Tablo 2.3) (de Leval L vd 2012). DBBHL'de tanımlanmış 3 yaygın morfolojik varyantlar; sentroblastik, immunoblastik ve anaplastik varyantlardır. Alt tiplerin identifikasyonunda hem morfolojik özellikler hem de özgün klinik prezantasyonlar değerlendirilmektedir. Moleküler ve immunohistokimyasal alt gruplar aşağıda daha detaylı tartışılacaktır. Tanımlanan kriterlere göre sınıflandırılmayan ve heterojen özellikler gösteren vakalar "DBBHL, NOS (not otherwise specified)" olarak adlandırılan alt grupta değerlendirilmektedir.

DBBHL hücreleri sıklıkla CD19, CD20, CD22 ve CD79a B-hücre belirteçlerini eksprese ederler. GC belirteçleri olan CD10 ve BCL6, sırasıyla vakaların %30-60 ve %60-90'ında eksprese edilmektedir.



Şekil 2.13 Büyük lenfoma hücreleri ile karakterize DBBHL'li bir olguya ait lenf nodülü kesiti (Mughal TI vd 2006).

Tablo 2.3. DBBHL: WHO 2008 lenfoma sınıflandırmasına göre varyantları, alt grupları ve alt tipleri

Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfomaların sınıflandırılması

Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma, başka bir şekilde sınıflandırılmamış (DLBCL, NOS)

Morfolojik varyantlar: sentroblastik, immunoblastik, anaplastik

Moleküler alt gruplar

İmmunohistokimyasal alt gruplar

Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma Alt tipleri

T-hücreli/histiyositçe zengin büyük B-hücreli lenfoma

Merkezi sinir sistemi Primer DBBHL

Primer kutanöz DBBHL, bacak tipi

İleri yaşta EBV-pozitif DBBHL

Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma Sınıfları

Primer mediyastinal büyük B-hücreli lenfoma (PMLBCL)

İntravasküler büyük B-hücreli lenfoma

Devamı arka sayfada

Kronik inflamasyonla ilişkili DBBHL

Lenfomatoid granülomatoz

Anaplastik lenfoma kinaz-pozitif büyük B-hücreli lenfoma (AKL+DBBHL)

Plazmablastik lenfoma (PBL)

HHV8-ilişkili multisentrik Castleman hastalığından (MCD) kaynaklanan DBBHL

Primer efüzyon lenfoma (PEL)

2.6.5.1. Morfolojik değişimler

DBBHL, büyük B-hücrelerinin bir neoplazisidir. Olguların %80'i, GC sentroblastlarına benzeyen hücrelerden oluşur. İmmunoblastik tip ise (vakaların %10'u) %90'dan daha fazla immunoblast hücrelerini içerir. Diğer bir immünolojik varyant reaktif T- hücreleri ve histiyositlerin oluşturduğu belirgin bir backgrounda sahiptir ve dolayısıyla T- hücre ve histiyositlerden zengin bir varyantı oluşturur. Anaplastik tipte ise hücreler morfolojik olarak pleomorfik nükleuslu, geniş sitoplazmalı, sinüzoidal büyüme paternlidirler ve CD30 eksprese ederler. Çok nadir gözlenen bir diğer alt tip ise plazmablastik DBBHL'dir ve sıklıkla HIV-pozitif bireylerde gözlenir (Tablo 2.3).

2.6.5.2. Hücre orijini

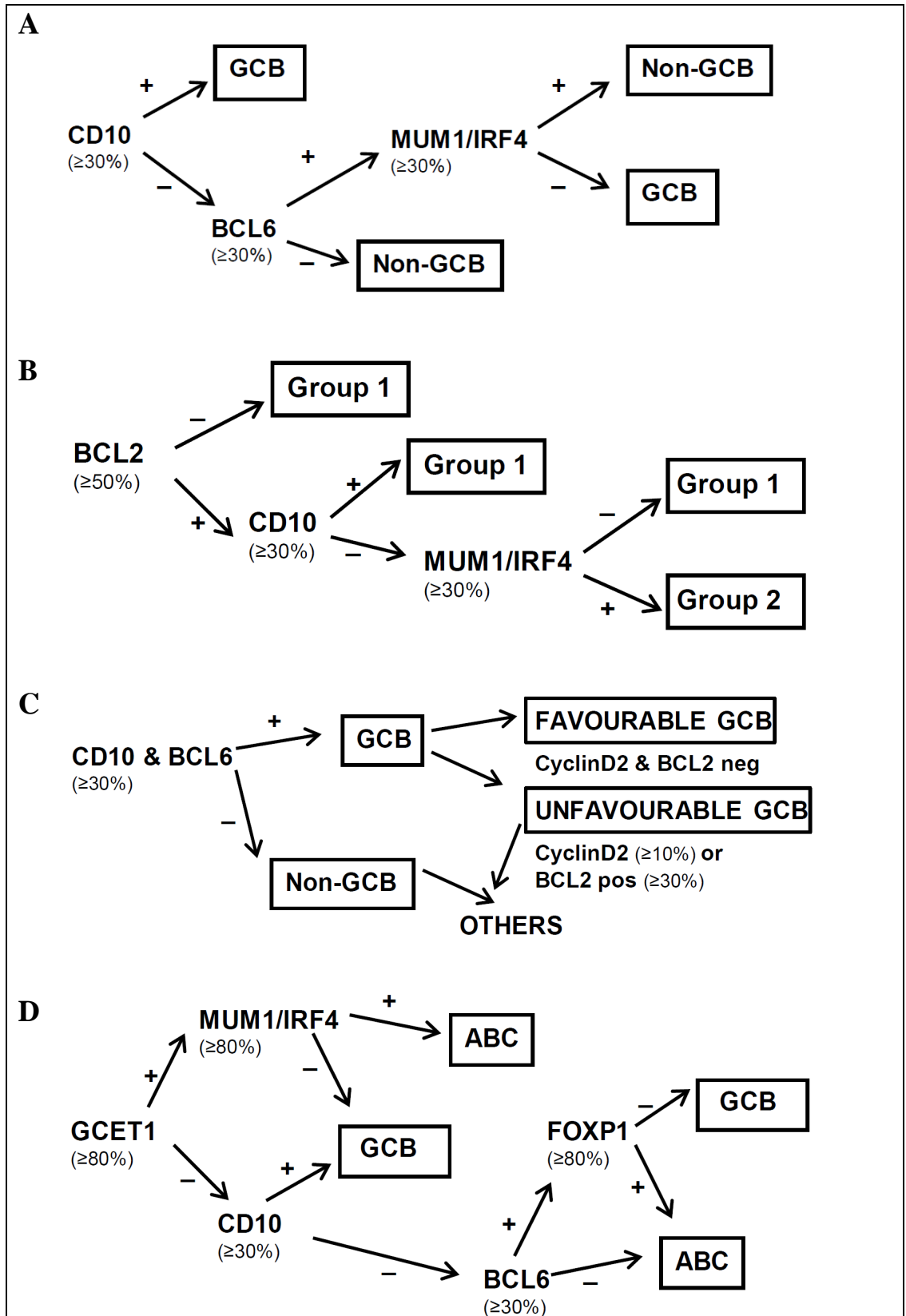
DBBHL, morfolojik ve sitogenetik açıdan oldukça heterojen bir hastalıktır. Bu heterojenitenin altında yatan mekanizmalarını tanımlamak amacı ile, farklı hücre orijinli DBBHL'li olgularda gen ekspresyon profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. "Lösemi ve Lenfoma Moleküler Profil Belirleme Projesi" kapsamında 2002 yılında 240 olguya ait biyopsi materyalleri DNA mikroarray ile analiz edilmiş ve farklı gen ekspresyon profillerine göre alt gruplar tanımlanmıştır. Bu çalışmada, günümüzde de hala geçerliliğini sürdüren en azından iki birbirinden bağımsız gen ekspresyon alt grubu tanımlanmıştır. Bu alt gruplar Germinal merkez B-hücre-benzeri (GCB) ve aktive B-hücre-benzeri (ABC) altgruplarıdır (Rosenwald A vd 2002).

Gen ekspresyon profillerindeki farklılıklara göre ayrılan bu iki moleküle alt grubun fenotipik özellikleri birbirine benzese de, klinik sonuçları birbirlerinden farklıdır. DBBHL olgularının yaklaşık %50'sini oluşturan GCB alt grubu, normal GC-B hücrelerinin sahip olduğu ekspresyon profiline sahiptir. Ancak, aktive B-Hücre-benzeri (ABC) olarak adlandırılan diğer alt grupta GC gen ekspresyonları gözlenmemektedir.

Bu alt gruptaki ekspresyon profili aktive olan B-hücrelerinin gen ekspresyon profillerine benzerlik göstermektedir (Alizadeh AA vd 2000). Gen ekspresyon profiline göre sınıflandırma yapıldığında, kemoterapi alan olgularda bu iki alt grup arasında prognoz açısından da farklılıklar gözlenmektedir ve GCB alt grubunda yer alan olgular daha iyi prognoza sahiptir (Wright G vd 2003, Thieblemont C vd 2011).

Gen ekspresyon profiline dayalı moleküler alt grupların identifikasyonu sonrasında, elde edilen verilerin IHC ile protein düzeyinde değerlendirilmesi yapılmıştır. Hans ve ark. tarafından 2004 yılında bu alt grupların tanımlanmasında kullanılabilecek bir algoritma oluşturulmuştur. Araştırmacılar gen ekspresyon profili ile sınıflandırılan alt grupları CD10, BCL6 ve MUM1/IRF4 ekspresyonuna göre GCB ve ABC alt grupları olarak sınıflandırabilmişlerdir (Şekil 2.14A). Bu algoritmaya göre, eğer olgu CD10-pozitif ise GCB alt grubuna, CD10 ve BCL6-negatif ise non-GCB alt grubuna aittir. Eğer olgu CD10-negatif ve BCL6-pozitif ise, MUM1/IRF4 ekspresyonu iki alt grubu ayırmada kullanılmaktadır. Buna göre MUM1/IRF4-negatif olgular GCB alt grubuna aitken, MUM1/IRF4-pozitif olgular non-GCB alt grubunda yer almaktadır. Hans algoritması olarak adlandırılan bu algoritmanın, aynı zamanda cDNA-mikroarray tabanlı sağkalım sonuçları ile de uyumlu olduğu ve 5 yıllık genel sağkalım oranlarının GCB fenotipli olgularda %76 iken non-GCB fenotipli olgularda %34 olduğu belirlenmiştir (Hans CP vd 2004). Çalışmadan elde edilen veriler cDNA-mikroarray sonuçları ile karşılaştırıldığında, olguların %21.1'inin sınıflandırılmadığı bildirilmiştir (Rimsza LM vd 2004).

Hans algoritması kullanılarak sınıflandırması yapılamayan olgularla ilgili çözüm bulmak ve DBBHL'de hücre orijininin tanımlanmasında yeni algoritma oluşturmak amacı ile birçok çalışma yapılmıştır. Bir başka ifade ile immunohistokimyasal olarak DBBHL'nin moleküler özelliklerinin tanımlanmasını hedefleyen birçok çalışma bulunmaktadır. Muris ve ark. (2006), GCB ve non-GCB proteinlerinin yanısıra anti-apoptotik bir protein olan Bcl2 ekspresyonunun da değerlendirildiği yeni bir algoritma tanımlamışlardır. Bcl2 ve CD10'un bağımsız prognostik belirteçler olarak değerlendirildiği bu algoritmada, olgular grup 1 (favourable; iyi klinik sonuç) ve grup 2 (unfavourable; kötü klinik sonuç) olarak sınıflandırılmıştır. Grup 2 olgular Bcl2-pozitif, CD10-negatif ve MUM1/IRF4-pozitif olgular iken, diğer fenotipik olgular grup 1'i oluşturmaktadır (Şekil 2.14B) (Muris JJ vd 2006).



Şekil 2.14 İmmunohistokimyasal olarak tanımlanan algoritmalarla DBBHL'nin hücre orijininin belirlenmesi ve moleküler klasifikasyonu. A) Hans ve ark.'nın algoritması (2004), B) Muris ve ark.'nın algoritması (2006), C) Amen ve ark.'nın algoritması (2007), D) Choi ve ark.'nın algoritması (2009).

DBBHL klasifikasyonu için oluşturulan bir diğer algorithmada, immunohistokimyasal olarak CD10, Bcl6, siklin D2 ve Bcl2 boyanma özellikleri değerlendirilmiştir. CD10 veya Bcl6- pozitif olgular GCB fenotipi olarak değerlendirilirken, CD10 ve Bcl6-negatif olgular non-GCB fenotipi olarak değerlendirilmiştir. GCB alt grubu aynı zamanda Bcl2 ve siklin D2 boyanma özelliklerine göre iyi klinik sonuç ve kötü klinik sonuç grubu olmak üzere 2 farklı gruba ayrılmışlardır (Şekil 2.14C) (Amen F vd 2007).

İmmunohistokimyasal olarak DBBHL'yı sınıflandırmak için oluşturulan yeni bir algoritma, kemoterapi ve immunoterapi alan hastalarda değerlendirilmiştir. Bu algorithmada GCET1, CD10, Bcl6, MUM1/IRF4 ve FOXP1 olmak üzere 5 belirteç kullanılmış ve olgular GCB ve ABC-benzeri alt gruplar olarak olarak 2 alt gruba ayrılmıştır. GCET1+/MUM1/IRF4-, GCET1-/CD10+ ve GCET1-/CD10-/Bcl6+/ FOXP1- fenotipine sahip olgular GCB alt grubunda yer alırlarken, diğer tüm fenotipler ABC-benzeri alt grupta değerlendirilmişlerdir. Bu algoritmanın gen ekspresyon profili ile uyumu %93 olarak belirlenmiştir (Şekil 2.14D) (Choi vd 2009).

DBBHL'nin Hodgkin lenfomaya benzeyen bir alt grubu daha vardır ve "Primer mediastinal B hücre lenfoması" (PMBL) olarak adlandırılmaktadır. PMBL, şu anda mevcut klinik kriterlere göre diğer alt gruplardan net olarak ayırt edilememektedir (Rosenwald, vd 2003, Savage vd 2003). Ancak, klinik olarak PMBL daha genç bireylerde (ortalama yaş 33) gözlenirken, GCB ve ABC alt gruplarına daha çok ileri yaş bireylerde (ortalama yaş >60) gözlenmektedir. Tüm Hodgkin-dışı lenfomaların %3'ünden daha az bir oranı oluşturmaktadır (The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project 1997).

PMBL'nin timustaki sınırlı sayıdaki B-hücre popülasyonundan köken aldığı düşünülmektedir. Diffüz büyüme paterni gösteren PMBL'de, tüm olgular B-hücre antijenlerini (CD19, CD20, CD22 ve CD79a) immunofenotipik olarak eksprese ederler. Bu olgular CD21-negatifler ve nadiren CD10 eksprese ederler. Aynı zamanda, yüzey immunoglobulin ekspresyonu yoktur ve HLA sınıf I ve sınıf II moleküllerini ya düşük düzeyde eksprese ederler ya da ekspresyon gözlenmez. Gen ekspresyon profil analizlerinden elde edilen veriler, PMBL alt grubu ve Hodgkin lenfoma arasında önemli bir ilişkinin var olduğunu göstermektedir. PMBL'de karakteristik olarak eksprese edilen genlerin 1/3'ünden fazlası, aynı zamanda Hodgkin lenfomalarda da eksprese olmaktadır. PMBL'de transkripsiyon faktörleri olan PAX5, BOB.1, Oct-2 ve PU.1

ekspresyonunun gözlenmesi ve CD15-negatifliği, olguların özellikle Hodgkin lenfomadan ayırımında önemlidir (The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project 1997, Pileri SA vd 2003).

2.6.6. Evreleme ve Risk Değerlendirilmesi

DBBHL için günümüzde belirlenen bir derecelendirme (grading) sistemi bulunmamaktadır. Önceleri immunoblastik varyantların yüksek dereceli olarak değerlendirilmesine karşın, sonraki yıllarda yapılan çalışmalar bu varyantın prognozla ilişkisi olmadığını göstermiştir.

DBBHL'nin evrelemesi Ann Arbor evreleme kalsifikasyonuna göre yapılmaktadır (Tablo 2.4). Bu evreleme sistemi orijinal olarak Hodgkin lenfomalar için önerilmiş olmakla birlikte, günümüzde rutin Hodgkin-dışı lenfomaların da evrelenmesinde kullanılmaktadır. Bu klasifikasyon primer olarak diyaframla ilgili lenfatik tutulumun dağılımına ve ekstralenfatik organ tutulumuna dayanmaktadır (Greer JP vd 2009, Türk Hematoloji Derneği 2012).

Tablo 2.4. Ann Arbor evreleme sistemi

Evre I	Tek lenf düğümü bölgesi (I) yada tek ekstralenfatik alan (IE)
Evre II	Diyafragmanın tek tarafında 2 ya da daha fazla lenf düğümü bölgesi (II) ya da diafragmanın tek tarafında lokal ekstralenfatik yayılımla birlikte bir ya da daha fazla lenf düğümü bölgesi (IIE)
Evre III	Diyafragmanın her iki tarafında lenf düğümü bölgeleri (III), lokal ekstralenfatik yayılım eşlik ediyorsa IIIIE, dalak tutulumu varsa IIIS, lokal ekstralenfatik tutulumla dalak tutulumu eşlik ediyorsa IIISE
Evre IV	Eşlik eden lenf düğümü tutulumu olsun ya da olmasın bir ya da daha fazla ekstralenfatik organın yaygın tutulumu
A/B	Son 6 ay içinde sistemik semptomların (Ateş, gece terlemeleri, vücut ağırlığının %10 kaybı) varlığına göre: A: Sistemik semptom yok B: Son 6 ay içinde bazal vücut ağırlığının %10'undan daha fazlasının kaybı, yineleyen ve açıklanamayan 38°C'nin üzerindeki ateş, yineleyen gece terlemeleri

Devamı arka sayfada

Kitlesel (bulky) hastalık	En büyük çapı 10 cm'nin üzerinde olan kitle ya da ön-arka akciğer grafisinde torakal 5-6 intervertebral disk düzeyinde hesaplanan en uzun transvers transtorasik çapın 1/3'ünü aşan mediastinal kitle
---------------------------	---

Uluslararası Prognostik İndeks (IPI)'te tanımlanan klinik prognostik faktörler, DBBHL'li olgular için risk ayırımında bir model oluşturmaktadır (Tablo 2.5) (Türk Hematoloji Derneği 2012). Ancak, IPI risk grupları içinde klinik sonuçlarda gözlenen farklılıklar bu hastalığın biyolojik ve klinik heterojenitesini yansıtmaktadır. Aynı zamanda yaşa-uygun IPI de kullanılabilir, ancak bu indeks özellikle yüksek-doz tedavi ve kök hücre transplantasyonu gibi yoğun tedavi programlarının yer aldığı çalışmalarda kullanılan bir indekstir. Tablo 2.6'da IPI ve yaşa-uygun IPI'ye göre belirlenen risk gruplarının 5 yıllık relaps-bağımsız ve genel sağkalım oranları gösterilmektedir (Sweetenham JW 2005).

Tablo 2.5. Uluslararası Prognostik İndeks (IPI)

Kötü risk faktörleri	Yaş > 60 yaş Serum LDH > 1 x normal Performans Durumu 2-4 (ECOG ölçütleri) Evre III-IV Ekstranodal tutulum > 1 bölge
IPI	Her risk faktörü bir puan olarak değerlendirilir
Düşük	0-1
Düşük-orta	2
Yüksek-orta	3
Yüksek	4-5

Tablo 2.6. IPI'ya ve Yaşa-uygun IPI'ya göre 5-yıllık rekürrens-bağımsız sağkalımla genel sağkalım oranları

Risk Grupları	Kötü risk Sayısı*	5-Yıllık Rekürrens- bağımsız Sağkalım (%)	5-Yıllık Genel Sağkalım (%)
<i>Uluslararası Prognostik İndeks</i>			
Düşük	0/1	70	73
Düşük-orta	2	50	51
Yüksek-orta	3	49	43
Yüksek	4/5	40	26

Yaşa-uygun Uluslararası Prognostik İndeks #			
Düşük	0	86	83
Düşük-orta	1	66	69
Yüksek-orta	2	53	46
Yüksek	3	58	32

*: Tablo 2.5'te tanımlanan kötü risk faktörleri

2.6.7. Tedavi

Hasta ve tümörün özelliklerine bağlı olmakla birlikte, DBBHL büyük ölçüde tedavi edilebilir bir hastalıktır. 25 yıldan fazla bir süredir siklofosamid, dokzorbicin, vinkristin ve prednizon (CHOP) tedavisi, DBBHL'nin tedavisinde altın standart olarak kullanılmıştır (Cabanillas F. 2010). Günümüzde kimerik anti-CD20 monoklonal antikor olan rituksimab (R) gibi monoklonal antikorların bu standard tedaviye eklenmesi (R-CHOP) ile daha iyi klinik sonuçlar elde edilmiştir. CD20, B-lenfoid kök hücrelerinde eksprese edilmezken, plazma hücrelerinde eksprese olur. B-hücre malignensilerinin büyük bir çoğunluğu (%90) CD20 molekülünü eksprese etmektedirler. Rituksimab'ın *in vitro* etki mekanizması antikor-bağımlı hücre aracılı sitotoksiteyi, kompleman-aracılı lizisi veya direkt apoptoz indüksiyonunu içermektedir (Smith 2003). Bu yeni tedavi yöntemi ile hastalarda hem progresyon-bağımsız sağkalımda hem de genel sağkalımda büyük ilerlemeler kaydedilmiştir (Gleissner B vd 2008).

DBBHL hızlı seyreden bir hastalık olduğundan, tedaviye en kısa sürede başlanmalıdır. Tedavi edilmediğinde, DBBHL'de ortalama sağkalım 1 yıldan daha azdır. Kemoterapi ve monoklonal antikor tedavi kombinasyonu (R-CHOP), hastaların büyük bir çoğunluğunu tedavi edebilmekle birlikte bazı hastalarda refraktör (tedaviye yanıt vermeyen) veya relaps (tedaviden sonra hastalığın yeniden nüks etmesi) hastalık gelişebilmektedir. Sekonder tedaviler bu tür hastaların tedavisinde başarılı olabilmektedirler. Relaps durumunda olog kök hücre transplantasyonu en uygun tedavi seçeneklerinden biridir ve destekleyici bir mekanizma olarak, tedavi sürecinde kemik iliği kök hücrelerin tükenmesinden kaynaklanan potansiyel öldürücü yan etkileri azaltmak için uygulanır. Kök hücre transplantasyonu ile birlikte yüksek-doz kemoterapi uygulaması özellikle başlangıç kemoterapinin başarısız olduğu durumlarda uygulanan bir tedavi seçeneğidir. Yüksek-doz kemoterapinin amacı, tedavi uygulamasının

sitotoksik etkisini kuvvetlendirerek, sağkalımı arttırmaktır (Vellenga vd 2008, Friedberg JW 2011).

Standart tedavi sonrası DBBHL'nin alt gruplarında klinik sonuçlar birbirlerinden oldukça farklılık göstermektedir. R-CHOP sonrası GCB alt grubu olgularının büyük bir çoğunluğu tedaviye yanıt verirken, ABC alt grubu olgularının yarısından fazlası tedavi edilememektedir. Gen ekspresyon profil çalışmaları malign olmayan hücrelerin kompozisyonunu (örn" tümör mikroçevresi) yansıtacak şekilde, DBBHL' yi "stromal-1" ve "stromal-2" olmak üzere 2 gruba ayırmıştır ve bu alt gruplar bireyin klinik sonucu ile oldukça ilişkili bulunmuştur. Prognozu daha iyi olan stromal-1 grubu ekstraseluler matriks birikimini ve histiyosit infiltrasyonunu yansıtmaktadır. Bunun aksine, prognozu daha kötü olan stromal-2 grubu ise bilinen birçok epitel hücre genlerini kapsamaktadır (Lenz G vd 2008).

2.6.8. Karsinogenez

2.6.8.1. Genetik aberasyonlar

DBBHL'de gözlenen genetik aberasyonlar kromozomal translokasyonları, aşırı somatik hipermutasyonlarla meydana gelen mutasyonları ve delesyon veya amplifikasyonların neden olduğu kopya sayısı değişimlerini içermektedir. DBBHL'de birçok farklı kromozomal değişimler tanımlanmıştır ve birçok DBBHL olgusu kompleks karyotipe sahiptir. DBBHL'de gözlenen kromozomal translokasyonlar, resiprokal ve dengeli translokasyonlardır. Birkaç istisna dışında, bu translokasyonlar gen füzyonuna neden olmazlar, ancak hedef genin ekspresyonunu deregüle ederler. Aşırı somatik hipermutasyonlar, fizyolojik somatik hipermutasyon mekanizmasının aşırı aktivitesinden kaynaklanan genetik lezyonların mekanizmasını oluşturur. Bu mutasyonlar hedef genlerin (özellikle proto-onkogenler) ekspresyonunu deregüle ederek veya protein fonksiyonunu değiştirerek karsinogenezde önemli rol oynarlar. DBBHL'de olguların %50'sinden fazlasında gözlenen bu hipermutasyonların hedef genleri arasında *MYC* ve *PIMI* yer almaktadır (Schneider C vd 2011, Pasquaalucci L vd 2001).

DBBHL'nin morfolojik, biyolojik, klinik açıdan oldukça heterojen olduğu ve konvensiyonel diagnostik yöntemlerle ayırdedilemeyen "GCB", "ABC" ve "PMBL" DBBHL olarak adlandırılan 3 moleküler alt sınıfının olduğu daha önceki bölümlerde

bahsedilmiştir. Bu üç alt grupta ortak genetik aberasyonlar gözlenmekle birlikte, bu aberasyonların görülme sıklıkları birbirlerinden farklıdır (Tablo 2.7) (Nogai H vd 2011). Aynı zamanda bu alt tiplerin B-hücrelerinin farklı evrelerinden köken aldıklarının bir yansıması olarak, her bir alt grupta gözlenen genetik aberasyonlar ve gen ekspresyon profilleri de birbirlerinden farklıdır. (Lenz G vd 2008).

Tablo 2.7. DBBHL moleküler alt gruplarında gözlenen genetik aberasyon ve görülme sıklıkları (Nogai H vd 2011).

Genomik Aberasyon	GCB DLBCL (%)	ABC DLBCL (%)	PMBL (%)
<i>BCL2</i> translokasyonu: t(14;18)	45	0	18
<i>BCL2</i> amplifikasyonu: 18q21	10	34	16
<i>REL</i> amplifikasyonu: 2p13	28	5	19
<i>CDKN2A</i> homozigot delesyonu: 9p21	1	20	0
<i>SPIB</i> amplifikasyonu: 19q13	3	26	3
Trizomi 3	1	26	0
Amplifikasyonu: 9p24	0	6	43
<i>PRDM1</i> mutasyonu/delesyonu (Blimp-1)	0	24	AE
<i>BCL-6</i> translokasyonu	10	24	33

(AE:Analiz Edilmemiş)

2.6.8.1.1. GCB-DBBHL ile ilişkili genetik aberasyonlar

GCB-DBBHL'nin gen ekspresyon profili normal GC-B-hücre ekspresyon profiline benzerdir (Alizadeh AA vd 2000). Ancak bu alt grup, birçok farklı genetik aberasyonlarla karakterizedir ve Tablo 8'de GCB-DBBHL ile ilişkili genetik aberasyonlar ve fonksiyonel / biyolojik sonuçları yer almaktadır. Olguların büyük bir çoğunluğunda gözlenen t(14;18), Bcl-2 onkogeninin ektopik ekspresyonuna neden olur. Bcl-2, önemli bir anti-apoptotik moleküldür. Bu alt grupta tanımlanan olguların yaklaşık %40'ında t(14;18) olmaksızın, Bcl-2 ve Bcl-6 ko-ekspresyonu gözlenebilmektedir. Bcl-2'nin kodlama yapan dizilerindeki mutasyonlar, Bcl-2 promoter dizilerindeki aşırı somatik hipermutasyonlar gibi mekanizmalar, bu durumdan sorumlu tutulmaktadır. Kromozomal translokasyonlar (sıklıkla t(8;14)) nedeniyle deregüle olan bir başka gen *MYC* onkogenidir ve olguların %15'inde *MYC* deregülasyonu gözlenmektedir (Schneider C vd 2011). DBBHL'de birçok kromatin modifiye edici enzimleri kodlayan genlerde mutasyonlar tanımlanmıştır. Özellikle

GCB-DBBHL alt grubunda bu mutasyonların prevalansı, diğer alt gruplara göre daha yüksektir ve olguların %21.7'sinde *EZH2* (bir polikomb-grup onkogen)'de rekürrent somatik mutasyonlar tanımlanmıştır (Morin RD vd 2010). Bir histon metiltransferaz olan *MLL2*'nin de mutasyona uğradığı ve sonuçta *MLL2*'nin inaktive edildiği bilinmektedir. Son yıllarda, epigenetik açıdan önemli olan histon asetiltransferazlardan CREBBP ve EP300'ün de sıklıkla mutasyonlar ve monoallelik delesyonlar nedeniyle inaktive oldukları bilinmektedir. Bu iki asetiltransferaz birçok sinyal yolağında transkripsiyonal ko-aktivatörler olarak görev yaparlar ve inaktive olmaları durumunda özellikle Bcl-6 ve p53'ü asetile etme yeteneklerini kaybettiklerinden bu genlerin transkripsiyonlarını baskırlar (Pasqualucci L vd 2011). GCB-DBBHL'de bu iki genin inaktivasyonu ABC-DBBHL alt grubuna göre daha yüksek sıklıkta gözlenmektedir (sırası ile %39 ve %17). DBBHL'de tanımlanan genetik aberasyonlardan en yaygın olanı ve GC oluşumunda da kritik rolü olan 3q27 lokusunda yer alan Bcl6 genini içeren yeniden düzenlenmelerdir. Tüm DBBHL olgularının yaklaşık %75'inde, GC-B hücrelerini yönlendiren fizyolojik somatik hipermutasyon mekanizmasının aktivitesini yansıtabilecek şekilde Bcl-6 geninin 5' regülatör bölgesinde mutasyonlar gözlenmektedir. Ancak bu mutasyonların belli bir grubu özellikle GCB-DBBHL alt grubunda yer alır ve patogeneze katılır (Schneider C vd 2011).

2.6.8.1.2. ABC-DBBHL ile ilişkili genetik aberasyonlar

ABC-DBBHL alt grubunun gen ekspresyon profili, plazma hücrelerine farklılaşma komutu almış GC-B hücrelerinin gen ekspresyon profiline benzerdir (Alizadeh AA vd 2000). İlginç olan, bu alt grupta NF- κ B hedef genlerin ekspresyonundaki artıştır ve NF- κ B'nin sürekli aktivasyonunun hastalığın patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir. Bir çok farklı genetik aberasyonlar, NF- κ B aktivasyonuna neden olabilirler (Tablo 2.8) (Schneider C vd 2011). En yaygın gözlenen aberasyonlardan biri de *TNFAIP3* (A20, negatif NF- κ B regülatör 20)'ün mutasyonlar ve/veya delesyonlar nedeniyle biallelik inaktivasyonudur ve olguların yaklaşık %30'unda gözlenir. A20, NF- κ B yanıtlarının terminasyonunda yer alan dual-fonksiyonlu bir ubiquitin-modifiye edici enzimdir ve GCB-DBBHL alt gruplarında A20 genetik aberasyonlarına nadiren rastlanır (Compagno M vd 2009). Normal B-hücrelerinde, NF- κ B'nin BCR ile uyarılan aktivasyonu için bir yapısal protein olan *CARD11* gereklidir. ABC-DBBHL alt grubunda yer alan olguların yaklaşık %10'unda *CARD11* geninde mutasyonlar gözlenmektedir. Bu mutasyonlara GCB-DBBHL alt grubunda nadiren rastlanır.

CARD11 mutasyonları, NF-κB'nin sürekli aktivasyonuna neden olurlar ve dolayısıyla bu lenfoma hücreleri BCR sinyal iletimi olmaksızın NF-κB sinyal iletimi aktive ederler (Lenz G vd 2008). Proksimal BCR alt ünitesini oluşturan CD79A ve CD79B mutasyonlarına, ABC-DBBHL olgularının yaklaşık %20'sinde rastlanılır. Bu mutasyonların kronik aktif BCR sinyal iletimi ile birlikte NF-κB, PI3K ve MAP-kinaz yollarını sürekli aktive ettikleri düşünülmektedir (Davis RE vd 2001). NF-κB aktivasyonuna neden olan bir diğer sinyal iletim yolağı Toll-benzeri reseptörler aracılığıyla. Bu reseptör aracılığı ile gerçekleşen sinyal iletim yolağında ortak adaptör protein MYD88'dir ve ABC-DBBHL olgularının yaklaşık %30'unda bu proteini kodlayan gende mutasyonlar belirlenmiştir. Bu mutasyonlar NF-κB sinyal iletim yolağının yanısıra JAK-STAT yolağını da aktive ederler (Ngo VN vd 2011). *PRDM1* geni tarafından kodlanan Blimp-1, plazma hücrelerine farklılaşma için gerekli bir transkripsiyonal represördür. ABC-DLBCL'lerin yaklaşık dörtte birinde *PRDM1* geninde gözlenen inaktive edici mutasyonlar ve delesyonlar, sözkonusu genin inaktivasyonu ve dolayısıyla da Blimp-1 ekspresyon kaybına neden olmaktadır. (Pasqualucci L vd 2006). Farklı genetik değişimler nedeniyle *PRDM1*'in inaktivasyonunun, B-hücrelerinin plazma hücrelerine farklılaşmasında bir probleme neden olduğu ve böylelikle ABC-DLBCL'nin moleküler patogenezinde katıldığı düşünülmektedir. Ayrıca, ABC-DLBCL'lerin yaklaşık olarak %25'i Bcl6 translokasyonu ile karakterizedir ve vakaların %26'sı *SPIB* amplifikasyonu yada artışı göstermektedir. Her iki durumda da Blimp-1 ekspresyonu ve blok farklılaşması baskılanmaktadır. (Lenz G vd 2008).

2.6.8.1.3. PMBL- DBBHL ile ilişkili genetik aberasyonlar

DBBHL'nin 3. alt grubunu oluşturan PMBL, GCB ve ABC-DLBCL'den net bir şekilde ayırt edilebilen karakteristik bir gen ekspresyon profili göstermektedir. PMBL alt grubu, Hodgkin lenfomalar gibi özellikle NF-κB olmak üzere belli onkogenik yollarını kullanır ve 9q24 amplifikasyonu gibi benzer genetik aberasyonları içerir (Tablo 2.8) (Schneider C vd 2011, Rosenwald A vd 2003, Savage KJ vd 2003). Gerçekten de PMBL alt grubunda en yaygın değişim 9q24 bölgesinde gözlenen kazanımlardır ve olguların yaklaşık %90'ında gözlenmektedir (Wessendorf S vd 2007). Amplifiye olan bu bölgede yer alan önemli genlerden biri, bir tirozin kinaz kodlayan JAK2'dir. Bunun yanı sıra T-hücre yanıtının önemli regülatörlerinden olan PDL1 ve PDL2 de bu bölgede lokalizedir. Diğer alt gruplarla karşılaştırıldığında, PMBL alt

grubunda bu 3 gen yüksek düzeyde eksprese edilmektedir (Rosenwald A vd 2003). Hodgkin lenfoma ile ortak bir başka benzerlik de kromozom 2p'deki kazanımlardır ve olguların yaklaşık %70'inde 2p14-16 kazanımları gözlenmektedir (Wessendorf S vd 2007).

Tablo 2.8. DBBHL moleküler alt grupları ile ilişkili genetik değişimlerin fonksiyonel ve biyolojik sonuçları

GCB-DBBHL			
GEN	GENETİK ABERASYON	FONKSİYONAL SONUÇLAR	BİYOLOJİK SONUÇLAR
BCL2	t(14;18) Mutasyonları	Ektopik Bcl2 ekspresyonu Bcl6-aracılı represyondan kaçış	Apoptoz inhibisyonu
MYC	t(8;14) t(2;8) t(8;22)	Ektopik ekspresyon Bcl6-aracılı represyondan kaçış	Proliferasyon ve sağkalımda artış
EZH2	Mutasyon aktivasyonu	Histon H3K27 trimetilasyonunda artış	Epigenetik yeniden programlanma
MLL2	Mutasyon inaktivasyonu	Histon H3K4 trimetilasyonunda azalış	Epigenetik yeniden programlanma
MEF2B CREBBP EP300	Nokta mutasyonları Mutasyon /delesyon inaktivasyonları	Bilinmiyor Asetiltransferaz aktivitesinde azalma Bcl6 asetilasyonunda bozukluk p53 asetilasyonunda bozulma	Bilinmiyor Epigenetik yeniden programlanma Artmış Bcl6 onkogenik fonksiyonu p53 tümör baskılayıcı aktivitesinde kayıp
PTEN	Delesyonlar	PIP3 negatif regülasyonunda kayıp	AKT sinyalizasyon yolağı aktivasyonu
PIK3CA	Mutasyon aktivasyonu	Artmış katalitik aktivite	AKT sinyalizasyon yolağı aktivasyonu
Bcl6	B6BS mutasyonları t(3;diğer)(q27;diğer)	Bcl6 otheregülasyondan kaçış Ekspresyon deregülasyonu	Artmış proliferasyon Apoptoza karşı direnç Farklılaşmada blokaj DNA hasarı yanıtında bozukluk
REL	Gen amplifikasyonu	Artmış gen dozajı	Net değil
ABC-DBBHL			
GEN	GENETİK DEĞİŞİM	FONKSİYONAL SONUÇLAR	BİYOLOJİK SONUÇLAR
TNFAIP3 (A20)	Biallellik Mutasyonlar/delesyonlar	NF-κB negatif regülasyonu kaybı	Sürekli NF-κB sinyalizasyonu Hücre sağkalımında artış
CARD11	Mutasyon aktivasyonu	Artmış NF-κB aktivasyonu	Sürekli NF-κB sinyalizasyonu Hücre sağkalımında artış
CD79A CD79B	Mutasyon aktivasyonu	Artmış BCR ekspresyonu Lyn aktivasyonunda azalma	Sürekli NF-κB sinyalizasyonu Hücre sağkalımında artış

Devamı arka sayfada

MYD88	Mutasyon aktivasyonu	IRAK1/IRAK4 kompleksinin spontane birleşmesi ve aktivasyonu	Sürekli NF-kB sinyalizasyonu JAK/STAT sinyalizasyonu aktivasyonu
BCL6	t(3;diğer)(q27;diğer)	Ekspresyon deregülasyonu	Proliferasyonda artış Apoptoza karşı direnç Farklılaşmada engel DNA hasarı yanıtında bozukluk
PRDM1 (BLIMP1)	Biallelik mutasyonlar/delesyonlar	PRDM1 fonksiyonunda kayıp	Farklılaşmada engel
BCL2	Gen amplifikasyonu	Bcl2 ekspresyonunda artış	Apoptoz inhibisyonu
INK4a/ARF	Homozigot delesyon	Fonksiyon kaybı	Apoptoz inhibisyonu p53 yolu inaktivasyonu

PMBL

GEN	GENETİK DEĞİŞİM	FONKSİYONAL SONUÇLAR	BİYOLOJİK SONUÇLAR
JAK2	Gen amplifikasyonu	Artmış gen dozajı	Proliferasyon ve hücrel transformasyonda artış
PDL1 PDL2	Gen amplifikasyonu	Artmış gen dozajı	T-hücre aracılı immun yanıtta kaçış
SOCS1 TNFAIP3	Homozigot delesyon Mutasyonlar/delesyonlar	JAK2 degradasyonu kaybı NF-kB negatif regülasyon kaybı	JAK2 sinyalizasyon artışı Konstitütif NF-kB sinyalizasyonu
REL	Gen amplifikasyonu	Artmış Gen dozajı	Hücre sağkalımında artış Bilinmiyor

2.6.8.2. Epigenetik değişimler

B-hücre lenfomalarında epigenetik mekanizmalarda gözlenen mutasyonlar ve epigenetik paternin bozulması sıklıkla gözlenen olaylardır. *EZH2* ve *MLL2* gibi histon metiltransferazları, *UTX* ve *JMJD2C* gibi histon demetilazları ve *CBP* ve *p300* gibi histon asetiltransferazları etkileyen somatik mutasyonlar lenfomalarda gözlenen ortak değişimler arasında yer almaktadır. Bu mutasyonlar kromatin yapısının değişmesine ve bazı proteinlerin fonksiyonunun bozulmasına neden olurlar ve sonuçta birçok genin yer aldığı mekanizmaları etkileyecek şekilde transkripsiyonal programlanmaya neden olurlar. Histon modifikasyonlarına neden enzimlerde meydana gelen mutasyonların yanı sıra, sitozin metilasyon paterninin değişmesi de B-hücre lenfomalarında önemli bir parametredir ve hatta bu paternler moleküler alt gruplarına göre spesifiklik göstermektedirler (Shacknovich vd 2010). Tüm bu epigenetik değişimler, lenfomaların tedavisinde yeni bir strateji olarak değerlendirilmektedir ve bu strateji ile anormal epigenetik mekanizmaların düzenlenmesi hedeflenmektedir.

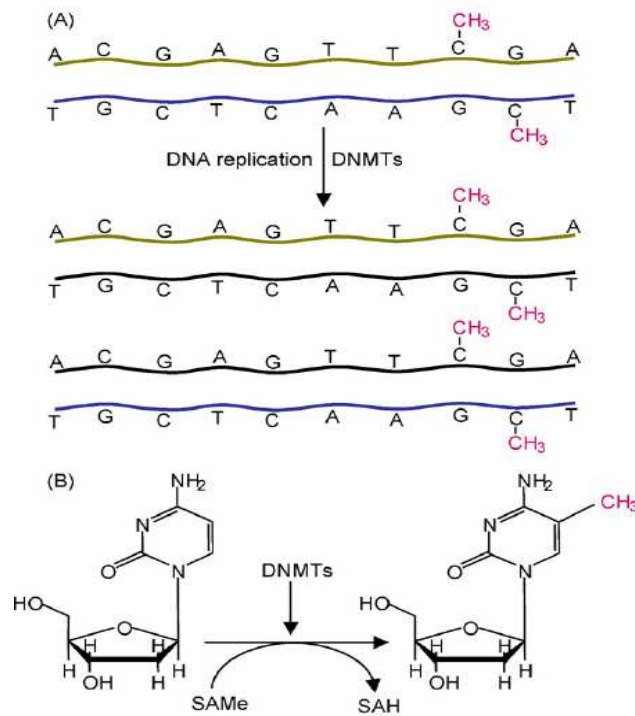
Epigenetik değişimler DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, kodlama yapmayan RNA'lar ve kromatin yeniden düzenlenmesi gibi farklı mekanizmaları içermektedir. Tez çalışması ile ilgili olduğundan, bu bölümde sadece DNA metilasyonu üzerinde durulacaktır.

2.6.8.2.1. DNA Metilasyonu

İnsan genomunda genetik bilginin yanısıra, genetik bilginin ne zaman, nerede ve nasıl kullanılacağını belirleyen epigenetik bilgi de yer almaktadır. Dolayısıyla, DNA'daki bilginin doğru yorumu; DNA dizisine, kromatin fiberlerin 3 boyutlu yapısına, kromatin fiberlerle ilişkili proteinlere ve diğer nükleer kompartmanlara bağlıdır. DNA dizisinde değişiklik olmaksızın, özel bir genomik lokusun veya bir kromozomun sonucunu değiştirebilen tüm moleküler mekanizmalar “epigenetik mekanizmalar” olarak tanımlanmaktadır. Epigenetik mekanizmalardan histon modifikasyonları ve nükleozom yeniden düzenlenmeleri kısa süreli ve lokal epigenetik değişimler iken, DNA metilasyonu uzun süreli bir epigenetik değişimdir.

DNA metilasyonu tek kalıtılabilir epigenetik belirteç olduğundan, DNA metilasyon paternlerinin yavru hücrelere doğru aktarımı ve korunması, hücre döngüsünün önemli bir mekanizmasıdır. İnsan genomunda metile DNA, temel olarak repetitive fraksiyonlarda (α ve β satellitler gibi) ve CpG dinükleotidlerinde yer almaktadır. CpG dinükleotidleri genomda rastgele dağılmamışlardır. Toplam GC içeriğine ve gözlenen CpG/beklenen CpG oranına göre “CpG fakir bölgeler” (genellikle metile) ve “CpG adaları” (genellikle hipometile) olarak 2 grup altında değerlendirilirler. CpG adaları insan genomunda yer alan genlerin yaklaşık %40'ının 5' uç bölgelerinde (promoter, UTR ve Ekzon 1) lokalizedir ve bu adalarda meydana gelen DNA metilasyonu, ilgili genlerin transkripsiyonal baskılanmasından sorumlu önemli bir epigenetik mekanizmadır (Espada J ve Esteller M 2010). Son yıllardaki çalışmalar, birçok DNA metilasyon varyasyonlarının “CpG ada kıyıları” olarak adlandırılan ve CpG adalarına yakın bölgelerde meydana geldiklerini göstermiştir. Bu kıyıları, CpG adalarına 2 kb'dan daha düşük uzaklıktadır ve daha düşük CpG yoğunluğuna sahiptirler. Doku spesifik farklı bir biçimde metile olan bölgelerin (Differentially methylated region; DMR) büyük bir çoğunluğunun CpG ada kıyıları ile ilişkili olduğu ve kanserde DMR'larla %45 örtüştüğü gösterilmiştir. Bu kıyıları evrim boyunca da sıkı korunmuşlardır (Dahl C vd 2011).

CpG nükleotidlerinde DNA metilasyonundan sorumlu enzimler, DNA metiltransferaz (DNMT) protein ailesinin üyeleridir. Bu enzimler metil gruplarının donörü olarak S-adenozil-L-metiyonin (SAdMet)'i kullanırlar. Bu süreçte SAdMet'den S-adenozil homosistein (SAH) oluşur. DNMT'ler sadece genomda metilasyon paterninin oluşmasından sorumlu değildir, aynı zamanda DNA replikasyonu takiben parental iplikteki metilasyon paterninin yeni oluşan iplikte de korunmasında rol oynarlar (Şekil 2.15).



Şekil 2.15 DNA metilasyonunun kimyasal temeli. (A) Memeli genomunda DNA metilasyonu, hemen hemen sadece CpG dinükleotidlerindeki sitozin rezidülerinde meydana gelir. Simetrik olarak metile CpG dinükleotidlerin paterni, DNMT'lerin katalizlediği bir mekanizma ile DNA replikasyonu sırasında kopyalanır ve korunur. (B) DNMT'ler, metil grubu kaynağı olarak S-adenozil-l-metiyonin (SAdMet)'i kullanır (SAdMet, metil grubunu verince S-adenozil homosisteine (SAH) dönüşür. DNA metiltransferazlar, sitozinin primidin halkasının 5'-pozisyonuna metil grubunun eklenmesini katalize ederler (Espada ve Esteller 2010).

Memelilerde DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B ve DNMT3L olmak üzere 5 farklı DNA metiltransferaz ailesi üyesi bulunmaktadır. DNMT1, somatik hücrelerde en fazla bulunan DNMT'dir ve DNMT1'in DNA replikasyonu sırasında DNA metilasyon

paterninin kopyalanmasından ve korunmasından sorumlu primer enzim olduğu düşünülmektedir. DNMT3A ve DNMT3B başlıca embriyonik ve non-diferensiyel hücrelerde ve embriyo implantasyonu (embriyo genomunda “*de novo*” DNA metilasyon dalgalarının meydana geldiği sırada embriyo gelişiminin kritik bir basamağıdır) sırasında eksprese edilir. Bu nedenle her iki protein de “*de novo*” DNMT’ler olarak adlandırılırlar. DNMT2, diğer DNMT’lerden farklı olarak N-terminal regülasyon domainini içermez ve bu nedenle daha düşük DNA metiltransferaz aktivitesine sahiptir (Espada J ve Esteller M 2010).

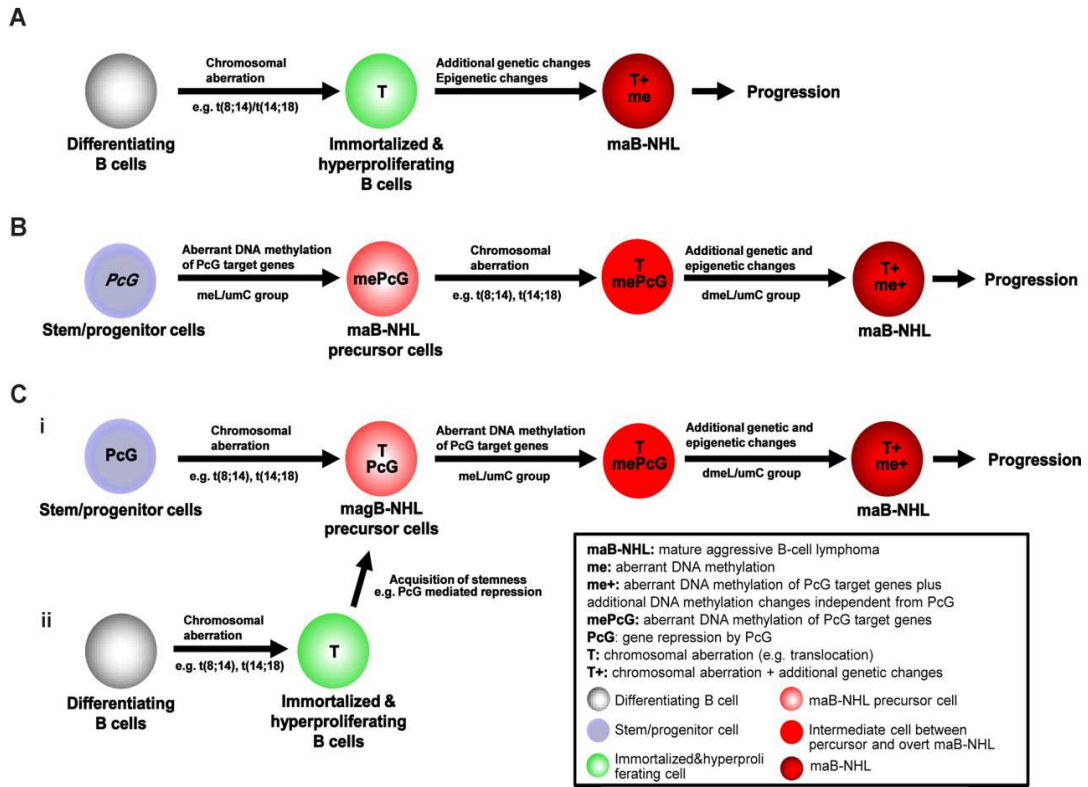
DNA metilasyonu en azından 3 farklı mekanizma ile transkripsiyonal sessizleşmeye neden olabilir. Bu mekanizmalar “i) CpG metilasyonu, dizi-spesifik Transkripsiyon faktörlerinin (E2F, CREB ve c-myc gibi) bağlanmasını kendiliğinden inhibe eder, ii) CpG metilasyonu, nükleozom pozisyonunda değişikliğe neden olur ve iii) CpG metilasyonu, metile CpG dinükleotidlerini tanıyan diğer nükleer faktörleri bölgeye toplar ve transkripsiyon faktörleri gibi diğer faktörlerin bağlanmasını geciktirir” olarak sınıflandırılabilirler (Espada J ve Esteller M 2010).

2.6.8.2.2. DBBHL’de DNA metilasyon profili

Normal ve malign B hücre gen ekspresyon profillerindeki farklılıkların bir bölümü, CpG dinükleotid metilasyonları gibi farklı epigenetik modifikasyonlardan kaynaklanmaktadır. Genom boyunca sitozin metilasyonundaki dağılımın bozulması, kanserlerde gözlenen ortak değişimlerden biridir ve özellikle promotorların hipermetilasyonu ve hipometilasyonu ile karşılaşılır. Tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen DNA metilasyonu, birçok tümör tiplerinde iyi tanımlanmış bir onkogenik mekanizmasıdır (Hayslip J ve Montero A 2006). DBBHL’de de birçok gen bölgesinde anormal DNA metilasyonu gözlenmektedir. Örneğin DBBHL olgularının %30’undan fazlasında bir DNA tamir geni olan *MGMT* nin promotor hipermetilasyonu gözlenir (Sen Turk N vd 2011, Hiraga J vd 2006). Martin-Subero ve ark., metilasyon kanser paneli kullanarak 38 erişkin agresif B-hücre lenfomasında (Burkitt lenfoma ve DBBHL) 807 gendeki 1505 CpG adalarını incelemişler ve lenfomada hipermetile olan 56 geni tanımlamışlardır. Hipermetile olan genlerin (kontrol grubunda unmetile lenfoma grubunda metile olan) biyolojik fonksiyonlarını fosfolipaz C aktivasyonu, G-

protein sinyal iletimi, fosfatidilinositol-aracılı sinyal iletimi ve G-protein eşikli reseptör sinyal iletim yolağı üzerinde gösterdiklerini belirlemişlerdir. Kontrol grubunda unmetile ancak lenfoma grubunda farklı derecelerde metile olan genlerin ise hücre farklılaşmasının negatif regülasyonunda, IFN- γ biyosentez basamağında, IFN- γ biyosentez mekanizmasının regülasyonunda, IFN- γ üretiminde ve gelişim mekanizmasının negatif regülasyonunda yer aldıklarını belirlemişlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri bu verilerden yola çıkarak, erişkin agresif Hodgkin-dışı lenfomaların lenfomagenezini açıklayan bir model oluşturmuşlardır (Şekil 16). Bu çalışmanın bir diğer önemli bulgusu da, GCB ve ABC moleküler alt grupları arasında DNA metilasyon paterni açısından bir farklılığın bulunmamasıdır (Martín-Subero JI vd 2009). Ancak, Pike ve ark., sınırlı sayıda olgu ile tamamladıkları çalışmalarında iki alt grup arasında 15 genin (*FLJ21062*, *GNMT*, *ONECUT2*, *CYP27B1*, *DRD1*, *KL*, *MINT2* ve *NEUROG1* gibi) farklı metilasyon paterni gösterdiklerini belirlemişlerdir (Pike BL vd 2008). Shacknovich ve ark., yaklaşık 14.000 gen promoter'ında dağılmış olan 50.000 CpG'lerin DNA metilasyon durumlarını analiz ettiklerinde, GCB ve ABC moleküler alt gruplarında farklı metile olan 263 geni tanımlamışlardır. GCB ve ABC moleküler alt gruplarında farklı metile olan genlerin TNF α /sitokin ağı üzerinde yer aldıkları belirlenmiştir. Araştırmacılar, GCB ve ABC moleküler alt grupların ayırımında bu epigenetik paternin kullanılabileceğini ve bu paternlerin önemli biyolojik belirteçler olarak değerlendirilebileceğini önermişlerdir (Shacknovich R vd 2010).

Polikomb proteinler (PcP), gelişim ve hücre farklılaşma sırasında epigenetik bilginin oluşturulmasında ve korunmasında kritik rol oynayan kromatin regülatörleridir. Bu proteinler Polikomb Represif Kompleks 1 (PRC1) ve PRC2 olarak adlandırılan 2 kompleks halinde organize olurlar. EZH2, PRC polikomb kompleksinin katalitik alt ünitesidir ve yapısında bulunan SET domaini, H3K27 (transkripsiyonal sessizleşmeden sorumlu bir histon modifikasyonu) trimetilasyonunu katalizler (Cao R vd 2002). EZH2, lenfoid progenitör hücrelerde aşırı ekspresyon olurlar ve EZH2 yetmezliğinin erken lenfopoeziste defektlere neden olduğu bilinmektedir. EZH2 aynı zamanda normal GC B- hücrelerinde aşırı ekspresyon olur ve bu nedenle de özellikle GC kökenli DBBHL'nin patogeneziinde yer aldığı düşünülmektedir (Morin RD vd 2010). EZH2'nin normal GC B-hücrelerindeki fonksiyonları 'i) Birçok tümör baskılayıcı genleri direkt repress ederek hücre proliferasyonuna yardım etmek, ii)

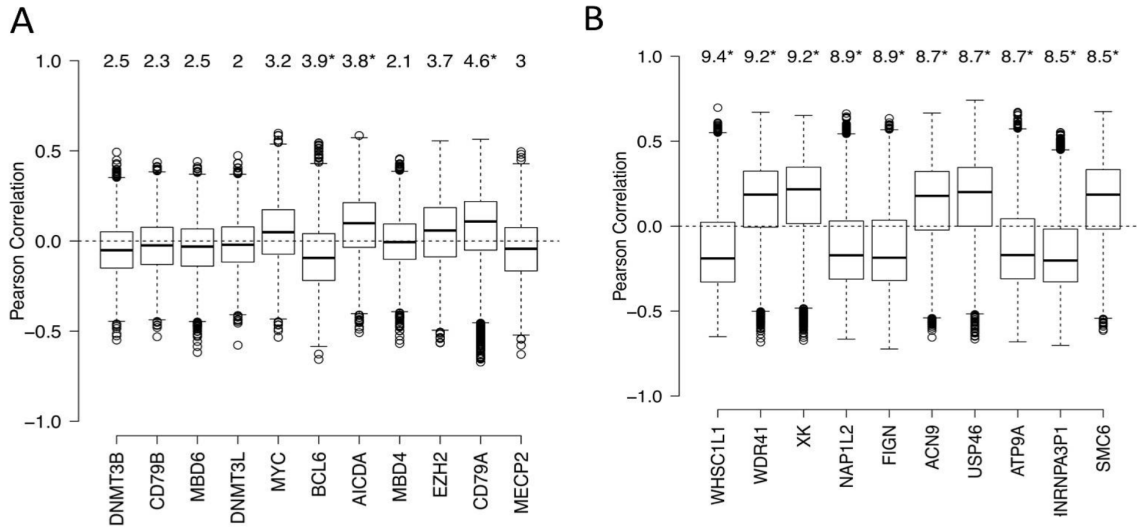


Şekil 2.16 Martín-Subero ve ark. tarafından erişkin agresif Hodgkin-dışı lenfomaların (Burkitt lenfoma ve DBBHL) lenfomajenezi için önerilen bir model. (A) Bir kromozomal aberasyonun primer immortalize edici etkisinin yer aldığı ve lenfomajenezin yaygın olarak kabul edilen genetik modeli. Bu modelde, kromozomal aberasyonu ek genetik ve epigenetik değişimler takip eder. (B) Erişkin agresif Hodgkin-dışı lenfomaların epigenetik orijini; kök hücre veya progenitör hücrelerde Polikomb-grup (PcG) hedef genlerin anormal metilasyonu, başlatıcı vuruş olarak etkisini gösterir. Sonrasında bu hücreler spesifik alt tiplerin oluşumuna neden olacak şekilde ek genetik ve epigenetik değişimler kazanırlar (C) Ya kök hücreler veya prekürsör hücrelerde (C1) ya da farklılaşmakta olan hücrelerde (C2) meydana gelen başlatıcı bir kromozomal aberasyon, bu lenfomaların genetik orijini oluşturur. PcG hedeflerinin anormal DNA metilasyonunun birinci koşulu, PcG proteinlerinin kök hücre ile ilişkili hedef genlere bağlanmasıdır. Bu koşul ya translokasyonların meydana geldiği hücre tipi aracılığı ile kazanılır (C1) ya da kök hücre benzeri özellikleri taşıyan bir hücre içinde yeniden programlanma aracılığı ile kazanılır (C2). Ek genetik ve epigenetik değişimler sonrasında hücrelerin PcG hedef genlerinde anormal DNA metilasyonu şekillenir ve tüm bu değişimler lenfomaya neden olur.

kendi kendine yenilemeyi uyararak ve prematür farklılaşmayı önlemek amacı ile kök hücrelerde bulunana benzer bir baskılama durumu oluşturmak ve iii) Naif B-hücrelerde daha önceden var olan transkripsiyonal baskılama durumunu korumak ve stabilize etmek' olarak gruplandırılabilir. EZH2, sentroblastlarda fonksiyonel olarak birbirleri ile ilişkili spesifik gen setlerine bağlanır. DBBHL'de metilasyon profilleri analiz edildiğinde, EZH2 B-hücre hedef genlerinin sıklıkla hipermetile oldukları bulunmuştur (Velichutina I vd 2010) Bu, normal B hücrelerinde olan PRC ve sitozin metilasyonunu

ayıran epigenetik bariyerin kırıldığı anlamına gelmektedir. Tüm bu veriler, DNA demetile edici ajanların (örn; decitabin) tek başına kullanılmaları yerine SET domain inhibitörleri ile birlikte kullanılmalarının, lenfoma hücrelerinin ortadan kaldırılmasında çok daha etkin bir strateji olabileceğini göstermektedir.

Kanser biyolojisinde epigenetik anormalliklerinin önemli bir rolü olduğuna dair veriler artmakla birlikte, bu anormalliklerin malign fenotipe nasıl katıldıkları henüz bilinmemektedir. Son yıllarda normal B-hücre popülasyonlarında ve Hodgkin-dışı lenfoma alt gruplarında genom-çaplı DNA metilasyon profili araştıran bir çalışmada, anormal metilasyon paternlerinin kromozomal bölgelere, gen yoğunluğuna ve komşu genlerin durumuna bağlı olarak değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. DNA metilasyon anormalliklerinin, hedef-gene spesifik olarak lenfomagenik transkripsiyonal regülatörlerin promoter DNA metilasyonunu değiştirmeleri ve CCCTC-bağlanan faktör (CTCF) insülatör bağlanma bölgelerinin yokluğunda, normal olmayan epigenetik durumun komşu promoter'lara yayılması olmak üzere 2 farklı mekanizma ile gerçekleştiği öne sürülmüştür. DBBHL'de lenfoid farklılaşması ve lenfomagenizde yer alan *DNMT3A*, *DNMT3B*, *DNMT3L*, *MYC*, *BCL6*, *AICDA*, *MBD4*, *MBD6*, *CD79A*, *CD79B* ve *MECP2* genleri (DNA metil transferazlar, metil-CpG'ye bağlanan proteinler, sinyal iletiminde rol oynayanlar ve transkripsiyon faktörleri) analiz edildiğinde, Bcl-6 ekspresyon düzeylerinin genom-çaplı skalada aşırı hipermetilasyonla ilişkili olduğu oysa *AICDA* ve *CD79A* ekspresyon düzeylerinin genom-çaplı skalada aşırı hipometilasyonla ilişkili olduğu belirlenmiştir (Şekil 2.17A). Çalışmada aynı zamanda lenfomada anormal metilasyon paterni ile ilişkili aday genlerin de *WHSC1L1*, *WDR41*, *XK*, *NAP1L2*, *FIGN*, *ACN9*, *USP46*, *ATP9A*, *HNRNPA3P1* ve *SMC6* oldukları yer almaktadır. İlginç olan bu genlerin bazılarının epigenetik modifiye edici genler olmalarıdır. Örneğin, listenin başında yer alan *WHSC1L1* geni bir histon metiltransferazdır ve kromatin bütünlüğünün korunmasında önemli rol oynar (Şekil 2.17B) (De S vd 2013).



Şekil 2.17 DBBHL’de aşırı DNA metilasyon paterni ile ilişkili genler. (A) DBBHL’de aşırı metilasyon paterni ile ilişki aday genlerin ekspresyon düzeylerinin Pearson korelasyon dağılımı. (B) Genom-çaplı analizde, ilk 10 sırada yer alan ve anormal metilasyon paterni ile ilişkili aday genlerin Pearson korelasyon dağılımı (De S 2013).

Son yıllarda yapılan çalışmalara göre, bir tümör baskılayıcı gen olduğu düşünülen “*Growth Arrest DNA Damage-Inducible 45 γ*” (*GADD45γ*)’nın da birçok farklı kanser türünde DNA metilasyonu aracılığı ile baskılandığı bilinmektedir. Solid tümörlerin aksine hematolojik malignansilerde *GADD45γ* metilasyon sıklığını araştıran çalışmalar oldukça sınırlıdır (Ying 2005, Zhang W vd 2010).

2.7. Growth arrest DNA damage-inducible 45 (*GADD45*) gen ailesi

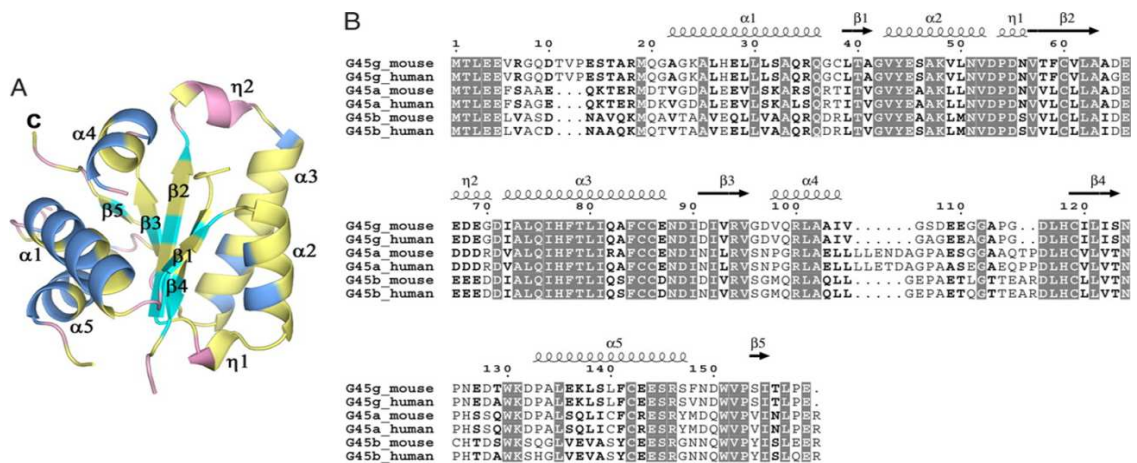
2.7.1. *GADD45* Gen Ailesi Üyeleri

DBBHL’nin patogenezinde, hücre döngüsü ve apoptotik yollarda düzensizliğe neden olan farklı mekanizmalar rol oynamaktadır. *GADD45* gen ailesi bu mekanizmalarda yer alan önemli bir gen ailesidir. *GADD45* gen ailesi üyeleri DNA tamiri, hücre döngüsü kontrolü, hücre gelişimi ve sağkalımı gibi hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynarlar (Tamura RE vd 2012).

GADD45 gen ailesi *GADD45α*, *GADD45β* ve *GADD45γ* olmak üzere 3 üyeden oluşmaktadır. İlk tanımlanan üye *GADD45α*’dır ve memeli hücrelerinde DNA hasarına karşı transkripsiyonunda artışla dikkati çekmiştir (Fornace vd 1989). *GADD45β*, myeloid lösemi hücre hatlarında IL-6 tarafından kısa süreli olarak indüklenen primer

yanıt geni olarak tanımlanmıştır ve *Myd118* olarak da bilinir (Abdollahi vd 1991). *GADD45* ailesinin üçüncü üyesi *GADD45γ* ise ilk olarak IL-2 ile uyarılan bir gen olarak tanımlanmıştır ve CR6 (Cytokine Response Gene 6) olarak da adlandırılmaktadır (Beadling C vd 1993). Bu gen ayrıca OIG37 (onkostatın-M indüklenebilir gen) (Nakayama K vd 1999) ve GRP17 (gadd-ilişkili protein 17kDa) (Suzuki M vd 1999) olarak da bilinir.

İnsan *GADD45* ailesi üyeleri evrimsel olarak sıkı korunmuşlardır ve aminoasit sekansları karşılaştırıldığında aralarında %55 oranında benzerlik olduğu görülmektedir (Şekil 18B) (Schrag vd 2008). 2008 yılında, *GADD45α* protein yapısı nükleer manyetik rezonans ile, fare *GADD45γ* proteinin yapısı ise kristalografi ile belirlenerek *GADD45* proteinlerinin moleküler yapısı aydınlatılmıştır (Sánchez vd 2008, Schrag vd 2008). Bu çalışmalarla her iki proteinin de 5 α -heliks ve 5 β -tabaka'dan oluştuğu belirlenmiş, ayrıca *GADD45 γ*'nin monomer yapısının, merkezde 5 farklı β tabakasının yer aldığı 3-katlı $\alpha\beta\alpha$ sandviç yapısında olduğu gösterilmiştir. Bu proteinin C-terminal bölgesinde lokalize olan $\beta 5$ tabakası, sadece 3 rezidüden oluşmaktadır ve paralel β tabakalarına hidrojen bağları ile bağlanmaktadır. Proteinin yapısında bir tarafta yer alan $\alpha 2$ ve $\alpha 3$ heliksleri ile bir diğer tarafta yer alan $\alpha 1$, $\alpha 4$ ve $\alpha 5$ heliksleri, β -tabakalarına paralel olacak şekilde konumlanmışlardır. *GADD45* izoformları arasında oldukça sıkı korunan rezidüer, $\alpha 2$ ve $\alpha 3$ helikslerinde ve β -tabakalarında yer alırlar (Şekil 18A). Aynı zamanda bu $\alpha 2$ ve $\alpha 3$ heliksler β -tabakalarıyla etkileşim halindedirler (Schrag vd 2008).



Şekil 2.18 *GADD45* izoformlarının monomerik yapısı ve dizi korunumları. (A) *GADD45γ* proteinin monomerik yapısı. Sekonder yapısal elementlerin de gösterildiği bu resimde tüm *GADD45* izoformlarında identikal olan rezidüer sarı renkle gösterilmektedir. (B) *GADD45* ailesi üyelerinin amino asit dizilimleri. İdentikal rezidüer gri kutular içine alınmıştır. *GADD45γ* kristal yapısında bulunan sekonder yapısal elementler dizilimler üzerinde gösterilmiştir.

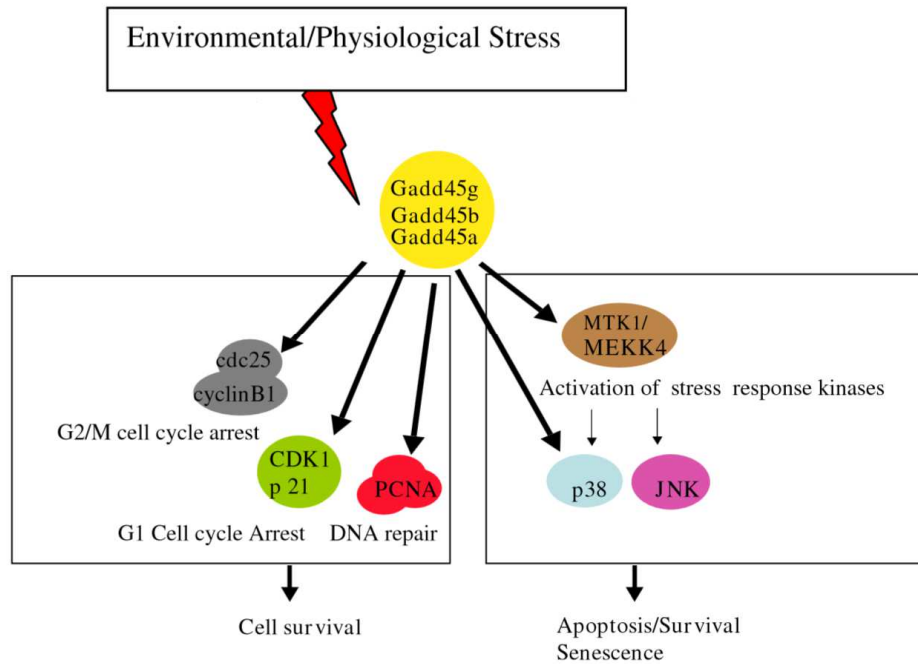
GADD45 gen ailesi üyeleri, yüksek homoloji gösteren küçük (18 kD) proteinleri kodlarlar ve oldukça asidik (pH~4.0-4.2) özellikte olan bu proteinler primer olarak hücre nükleusunda lokalizedirler (Carrier F vd 1994, Takekawa M vd 1998, Vairapandi M, vd 2002). *GADD45* proteinleri hem sağlıklı yetişkin hem de fetal dokularda eksprese olurlar. Bu proteinlerin ekspresyonu, hücre döngüsünün G1 fazında artarken, hücre döngüsünün S fazında düşmektedir (Kearsey JM vd 1995). *GADD45* protein düzeylerinin doku spesifikliğini araştırmak için yapılan çalışmalarda, *GADD45γ*'nın iskelet kasında, böbrekte ve karaciğerde yüksek seviyede; kalpte, beyinde, dalakta, akciğerde ve testiste düşük seviyede eksprese olduğu, *GADD45β*'nın iskelet kası ve karaciğerde orta seviyede; böbrek, kalp, iskelet kası ve dalakta düşük seviyede; karaciğerde yüksek seviyede eksprese olduğu, *GADD45α*'nın ise iskelet kasında ve böbrekte yüksek seviyede; karaciğer, kalp, beyin, dalak, akciğerde orta seviyede eksprese olduğu bulunmuştur (Zhang W vd 1999).

2.7.2. *GADD45* Proteinlerinin Hücre İçi Fonksiyonları

GADD45 gen ailesi üyeleri, birçok farklı çevresel ve fiziksel stress koşullarında memeli hücrelerin yanıtını integre eden stress sensörleri olarak görev yapmaktadırlar (Zhang W, vd 1999, Liebermann DA vd 1998). Aynı zamanda onkogenik strese yanıtta tümör oluşumunu azaltma yönünde etki yaptıkları da bilinmektedir (Tront JS, vd 2006). Her 3 protein de benzer fonksiyonlara sahip olmakla birlikte, stresin kaynağına ve buldukları hücre tipine göre aktive edildikleri yolların farklı olması nedeniyle, bu fonksiyonları identikal değildir. Bir başka ifade ile *GADD45* ailesi üyeleri farklı genotoksik ve çevresel stress ajanları tarafından farklı bir biçimde uyarılırlar (Zhang W vd 1999, Shaulian E ve Karin M. 1999). Örneğin; *GADD45β*, transforming growth factor- β (TGF- β) indüklü apoptozla aktive olurken *GADD45α*'nın aktive olmadığı gözlemlenmiştir (Azam N vd 2001). Tüm bu farklı uyarılar sonrasında, *GADD45* genlerinin hücre döngüsünün durdurulmasının kontrolünde (Vairapandi M vd 2002, Liebermann DA, Hoffman B. 1998), DNA tamirinde (Vairapandi M vd 2002, Liebermann DA ve Hoffman B.1998, Smith ML vd 2000), hücre canlılığının devamında (Smith ML vd 1996 Gupta M vd 2006), apoptozda (Yoo J vd 2003) *in vitro* transformasyon için hücrelerin duyarlılığında ve *in vivo* tümör gelişiminde (Tront JS vd 2006 Hollander vd 1999) yer aldıkları bildirilmiştir (Şekil 2.19). Aynı zamanda

GADD45 gen ailesi üyeleri kanser tedavisinde kullanılan non-steroidal anti-inflammatuvar ilaçların hedefi olarak değerlendirilmekte ve kanser hücrelerinin ölümünü uyarmak için bu ilaçların etkinliği için son derece önemli oldukları düşünülmektedir. Bir başka ifade ile, non-steroidal anti-inflammatuvar ilaçların apoptozu uyarma yetenekleri *GADD45* gen ailesi üyelerinin (özellikle *GADD45α* ve *GADD45γ*) ekspresyonuna bağlıdır (Zerbini LF vd 2006).

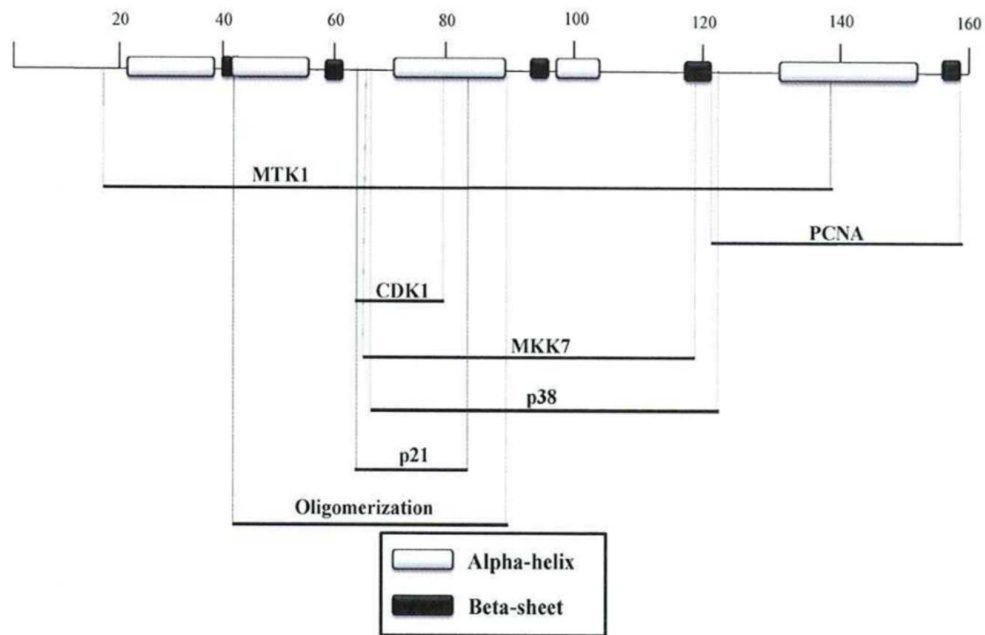
GADD45 proteinleri birbirleriyle etkileşime girerek homo- ve hetero-dimerler oluşturabilirler. Bu etkileşimlerin fonksiyonlarında önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir. Kristallografi ve mutasyon analizleri, fare *GADD45γ* proteininin merkezindeki yer alan α -heliks 2 ve 3 bölgelerinin dimerizasyon için gerekli olduğunu göstermişlerdir. α -heliks 3 L80 bölgesinde mutasyon olduğunda protein dimerizasyonu gerçekleşmez ve hücre büyümesi inhibe olmaktadır. Ayrıca *GADD45* proteinlerinin merkezi bölgesinde bulunan dimerizasyon domain'i protein etkileşimleri için önemlidir (Schrag JD vd 2008).



Şekil 2.19 Strese karşı sinyal iletiminde *GADD45* proteinleri. Resimde *GADD45* proteinlerinin partner proteinleri ile birlikte yer aldıkları hücresel stres yanıtlarının koordinasyonu yer almaktadır (Lieberman DA ve Hoffman B 2008).

GADD45γ'daki yüksek korunumlu bölgeler olan dimerizasyon bölgelerinin $\alpha 2$ ve $\alpha 3$ heliks bölgelerinde olduğu gösterilmiştir (Schrag vd 2008). *GADD45* proteinlerinin yardımcı proteinlerle olan etkileşimlerinin ve fonksiyonlarının belirlenebilmesi için

etkileşim bölgelerinin tanımlanması oldukça önemlidir. Şekil 2.20’de GADD45 proteinlerinin sekonder yapısı ve diğer proteinlerle olan etkileşim domainleri gösterilmektedir. GADD45 γ merkezi bölgesindeki dimerizasyonun ardından Cdc2, p21, p38 ve histon proteinleri ile etkileşime girdiği, ancak GADD45 γ ’daki L80E nokta mutasyonunun dimerizasyonu bloke ettiği gösterilmiştir. GADD45 ailesinin tüm üyeleri ‘Proliferation Cell Nuclear Antigen’ (PCNA) ile etkileşime girerler. Ayrıca, GADD45’in PCNA ile bağlanması p21WAF1/CIF ile yarışmalı olarak gerçekleşmektedir (Zhang vd 2008).



Şekil 2.20 GADD45 proteinlerinin sekonder yapısı ve etkileşim domainleri. Proteinin α -heliks yapıları beyaz kutu ve β -tabaka yapıları siyah kutu ile gösterilmiştir. Resimde ayrıca GADD45 proteinlerinin PCNA, CDK1, MTK1, p38, MKK7 ve p21 proteinleri ile olası etkileşim domainleri gösterilmiştir (Tamura vd 2012).

GADD45 proteinlerinin etkileşime girdiği diğer hücrel proteinler p21, cdc2/siklinB1, p38 ve JNK’dir (Cretu A vd 2009). Elde edilen veriler GADD45 α , GADD45 β ve GADD45 γ ’nın PCNA ile etkileşiminin, bu proteinin negatif büyüme kontrolündeki fonksiyonunu engellediğini göstermektedir (Vairapandi M. vd 2002). Her üç GADD45 ailesi üyesi de çevresel strese yanıt olarak bir upstream kinaz olan MTK1/MEKK4 ile direkt etkileşime girer ve p38/JNK yolağı aracılığıyla apoptoz indüksiyonu gerçekleşir (Takekawa M ve Saito H 1998). GADD45 proteinleri, bir hücre döngüsü düzenleyicisi olan cdc2/siklinB1 kompleksiyle de etkileşime girerek, bu

proteinin kinaz aktivitesini inhibe eder ve hücre döngüsünü G2/M fazında durdurur (Zhan vd 1999, Vairapandi vd 2002).

GADD45 proteinleri, alkilleyici ajanlar yada UV radyasyon tarafından meydana gelen DNA hasarı aracılığıyla da uyarılırlar (Fornace AJ vd 1988, Fornace AJ vd 1989). Yani GADD45 proteinleri normal hücrelerin malign hücelere transformasyonunu önlemede önemli rol oynarlar. GADD45 gen ekspresyonunun etkileyen proteinler arasında p53 ve p21 gibi tümör baskılayıcılar, moleküler indükleyiciler ve moleküler dengeleyiciler yer almaktadır (Kastan MB vd 1992, Jin S vd 2001).

2.7.3. GADD45 proteinleri ve NF- κ B

NF- κ B, B-hücrelerinde IgL zincirinin transkripsiyonunu aktive eden bir transkripsiyon faktörüdür. Uyarılmamış hücrelerde NF- κ B, sitoplazmada, inhibitör proteinle (I κ B) inaktif bir kompleks halindedir. I κ B ile oluşturulan kompleks NF- κ B'nin nükleer yerleşim sinyalini maskeler ve NF- κ B çekirdeğe taşınmaz. Uyarılan hücrelerde ise I κ B fosforillenir ve ubikütin-aracılı proteolizle yıkılır ve sonuçta NF- κ B çekirdeğe girerek hedef genlerde transkripsiyonu aktive eder (Geoffey vd 2006). NF- κ B, GADD45 proteinleri ekspresyonunun regülasyonunda rol alır. NF- κ B aracılığıyla gerçekleşen *GADD45 α* ve *- γ* ekspresyonunun regülasyonu, bir regülatör gen olan *c-myc*'nin upregülasyonu ile düzenlenir (Zerbini LF vd 2004). C-myc, WT1 ve Egr motifleri içeren guanin ve sitozin açısından zengin bölgelerle etkileşime girerek, GADD45 promotorunu inhibe eder (Barsyte-Lovejoy D vd 2004).

2.7.4. GADD45 Proteinleri ve hücre döngüsünde durma

UV radyasyona veya metil metansulfonata (bir metilleyici ajan) maruz kalan insan endotelial ve fibroblast hücrelerinde, antisens GADD45 aracılığı ile endojen GADD45 ekspresyonu bloke edildiğinde, hücrelerin G2/M kontrol noktasının bozulduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda primer insan fibroblastlarına *GADD45 α* eksprese eden bir vektör yerleştirildiğinde, hücrelerin G2/M sınırında durdukları gözlenmiştir. Bu veriler, belli genotoksik ajanlara yanıtta *GADD45 α* 'nın p53 aracılı G2/M hücre döngüsünde durma mekanizmasında yer aldığını göstermektedir. *GADD45 α* -yetmezlikli farelerde genomik instabilitenin gözlenmesi, bu proteinin G2/M hücre döngüsü ilerlemesini ve/veya DNA tamir mekanizmasını bozduğunu destekleyen bir bulgudur (Liebermann DA ve Hoffman B. 2007). *GADD45 γ* ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlı olmakla birlikte,

HeLa hücre hattı kullanılarak yapılan bir çalışma, *GADD45*γ'nın ektojik ekspresyonu deregüle edildiğinde, hücreler normal hücrelerden daha az gelişim göstermişlerdir. Kültür ortamından serumun uzaklaştırılmasını takiben, hücrelerde G2/M geçişi durmuştur. U2OS (bir osteosarkom hücre hattı) hücrelerinde ise tüm *GADD45* proteinlerinin ektojik ekspresyonlarının G1/S veya G2/M geçişini bloke ettikleri gözlenmiştir (Fan W vd 1999) Bu bulgular, *GADD45*γ proteinin de hücre döngüsünün durmasında rolü olduğunu desteklemektedir.

2.7.5. *GADD45* Proteinleri ve DNA Tamir Mekanizması

GADD45 proteinleri DNA tamir mekanizmasına da katılırlar. *GADD45*'ten yoksun farelerde radyasyon karsinojenezine, genomik instabilite ve kromozom abnormalitelerine, sentrozom amplifikasyonlarına, mitoz ve sitokinez düzensizliklerine olan hassasiyetin arttığı gösterilmiştir (Hollander MC vd 1999). Ek olarak *GADD45*'ten yoksun farelerde NER (Nükleer Eksizyon Tamiri) aktivitesinde düşüşe karşın mutasyon seviyelerinde ve kimyasal açıdan indüklenen karsinojeneze olan hassasiyette artış gözlenmektedir (Hollander MC vd 2001). *GADD45* proteinlerinin DNA tamir mekanizmasına katılımı, DNA tamir proteinleriyle etkileşimiyle gerçekleşmektedir. DNA zararlı ajanlara maruz kaldığında, PCNA proteini DNA replikasyon bölgesinden DNA hasarının olduğu bölgeye geçer (Essers J vd 2005) ve Nükleer Eksizyon Tamiri (NER), Nokta Mutasyon Tamiri (MMR) ve Baz Eksizyon Tamiri (BER) gibi mekanizmaları tetikler (Stoimenov I ve Helleday T 2009). *GADD45* ve PCNA etkileşiminin bozulduğu (Smith ML vd 1994) veya *GADD45* genlerinin susturulduğu durumlarda PCNA, DNA hasar bölgesinden ayrılır ve sonuçta hücrenin DNA tamir kapasitesi azalır (Smith ML vd 2000).

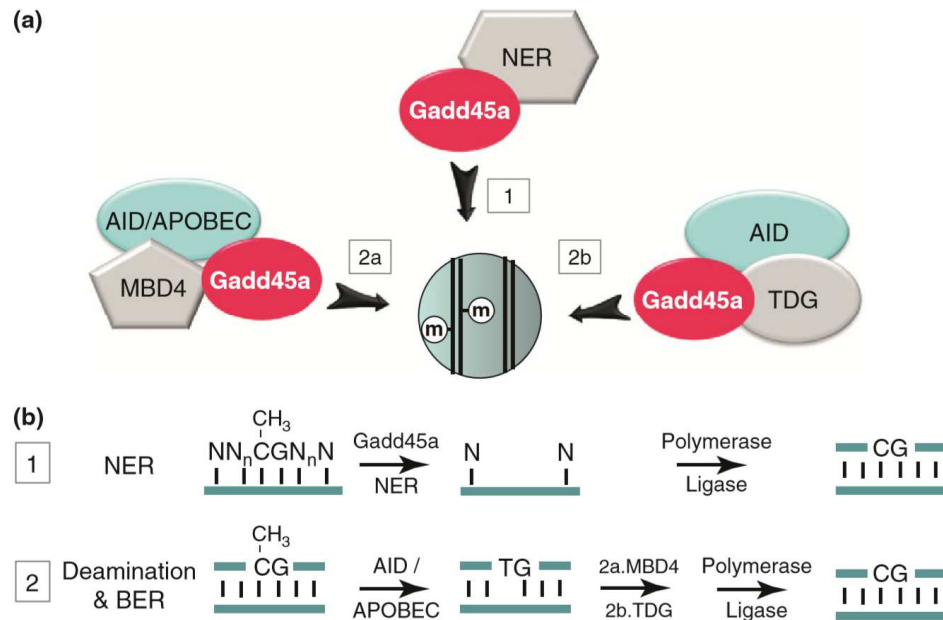
2.7.6 *GADD45* proteinleri ve DNA demetilasyonu

DNA demetilasyonu pasif ya da aktif olarak iki farklı mekanizma ile gerçekleşir. Pasif DNA demetilasyonu bölünmekte olan hücrelerde görülür. DNMT1, hücre replikasyonu süresince DNA metilasyonunu etkin bir şekilde sürdürürken, DNMT1'in inhibisyonu yada disfonksiyonu sonucu yeni sitozin unmetile olarak kalır ve sonuçta her hücre bölünmesinde genel metilasyon düzeyi azalır. Aktif DNA demetilasyonu hem bölünen hem de bölünmeyen hücrelerde meydana gelebilir. Bu mekanizmada da

5mC'nin sitozine geri dönüşebilmesi için enzimatik reaksiyona ihtiyaç duyulmaktadır (Mayer vd 2000, Oswald vd 2000, Paroush vd 1990).

Aktif DNA demetilasyonu mekanizması net olmamakla birlikte, DNA tamiri aracılığıyla gerçekleşen 3 alternatif demetilasyon mekanizması önerilmektedir:

1. BER aracılığıyla: Metillenmiş/oksidlenmiş bazın unmetile sitozinle değişimi
2. BER aracılığıyla: 5mC'in deaminasyonu
3. NER aracılığıyla: 5mC'in uzaklaştırılması (Şekil 2.21).



Şekil 2.21 DNA demetilasyonunda yer alan GADD45 ve kofaktörleri (a) Bir nükleozom içinde bir metile CpG'nin demetilasyonunda yer alan GADD45 α proteini. (b) NER aracılığı veya BER aracılığı ile 5mC'nin deaminasyonu. N_n- NER ile uzaklaştırılan nükleotid (35 nükleotide kadar); AID-Aktivasyonla uyarılan (sitidin) deaminaz; MBD4-Metil CpG'ye bağlanan domain proteini 4; TDG-timin DNA glikozilaz (Niehrs C ve Schafer A 2012).

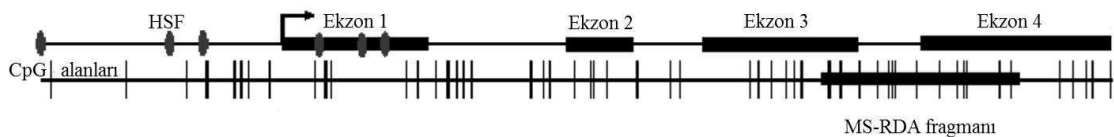
Bu mekanizmalar dışında, bir diğer aktif DNA demetilasyon mekanizması da bulunmuştur. Bu mekanizma 'ten-eleven translokasyon' (Tet) enzimleriyle (Tet1, Tet2, Tet3) düzenlenmektedir. Tet enzimleri, 5mC'in metil grubuna bir hidroksil grubu ekler ve 5-hidroksimetilsitozin (5hmC) oluşur (Tahiliani vd 2009; Ito vd 2010). Genomda 6.baz olarak da adlandırılan bu yeni bazın oluşumunun da DNA metilasyonu gibi gen ekspresyonunun düzenlenmesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu teoriye destek

olacak şekilde, 5mC'nin 5hmC'ye dönüşümü ile baskılayıcı etkiye sahip metil CpG'ye bağlanan protein (MeCP2)'in hedefe bağlanmasının engellediği bulunmuştur (Valinluck vd 2004, Moore LD vd 2013).

Tümör baskılayıcı genler oldukları düşünülen *GADD45* genlerinin de düşük ekspresyonları, genellikle bu genlerin promotor bölgelerinin metilasyonu ile ilişkili bulunmuştur (Tamura vd 2012, Zerbini L ve Libermann A 2005). DNA metilasyonu genellikle stabil epigenetik modifikasyon olarak değerlendirilmesine rağmen, aslında enzimatik DNA demetilasyonu sayesinde geri dönüşümlü ve dinamik bir mekanizmadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, *GADD45* proteinlerinin DNA demetilasyonunda rol oynadıklarını göstermektedir. *GADD45* proteinleri, DNA tamir mekanizması molekülleri ve kromatin arasında bir adaptör protein gibi davranarak 'Epigenetik' ve 'DNA tamiri' arasında bir bağ oluşturur (Niehrs C ve Schafer A 2012).

2.7.7. *GADD45γ* geni

GADD45γ geni kromozom 9q22.2'de lokalizedir. 1543 bp büyüklüğündeki *GADD45γ* geni 4 ekzon bölgesi içermektedir. Bu gen 159 aa uzunluğunda ve 17 kDa büyüklüğünde bir proteini kodlar. Ensembl veritabanı analizleri tüm genin ve upstream bölgesinin bir CpG adasında gömülü olduğunu göstermiştir. *GADD45γ* geninin yapısı ve CpG alanları Şekil 2.22'de yer almaktadır.



Şekil 2.22 *GADD45γ* geninin yapısı ve CpG alanları. Okla gösterilen bölge, “transkripsiyon başlama bölgesi”dir. HSF: Kor promotor bölgesinde bulunan 6 adet Isı Şok Faktörleri, MS-RDA fragmanı: “Methylation-sensitive representational difference analysis” ile belirlenen hipermetile fragman (Ying vd 2005).

Yukarıda tartışılan veriler eşliğinde, bu çalışmadaki hipotezimiz, DBBHL'lı olgularda *GADD45γ* protein ekspresyonunun bir epigenetik modifikasyon olan DNA metilasyonu aracılığı ile azaldığı ve bunun da apoptotik süreci etkileyeceğidir. Bu kapsamda malign olmayan reaktif lenfoid doku ve DBBHL'li doku örneklerinde *GADD45γ*'nin metilasyon ve ekspresyon profillerinin belirlenmesi, metilasyon ile ekspresyon profilleri arasındaki korelasyonun ortaya koyulması ve bu profillerin apoptozla olası ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

3.MATERYAL VE METOD

3.1.Materyal

Bu çalışmada Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim dalında 2009-2012 tarihleri arasında histopatolojik olarak incelenen ve DBBHL tanısını alan 40 olgu grubu ve 40 kontrol grubuna (reaktif lenfoid doku, RLD) ait %10 formaldehit solüsyonu ile tespit edilen ve sonrasında parafin bloklara gömülü (FFPE) arşiv doku örnekleri değerlendirildi.

Toplam 80 olguya ait doku örnekleri laboratuvarımızda numaralandırıldı ve örneklerin kayıt işlemleri gerçekleştirildi. Olgu ve kontrol grubuna ait hastaların yaşları, cinsiyetleri ve klinik bilgiler, hastalara ait Patoloji raporları ve Hematoloji hasta dosyalarından elde edildi.

Her bir olguya ait FFPE doku örneklerinden alınan ardışık 2 kesit DNA izolasyonu amacıyla kullanılırken, 3 adet kesit IHC analizinde (Bcl-2, Bcl-x_L ve GADD45 γ proteinlerini içerir) ve 1 kesit de TUNEL yönteminde kullanıldı.

Bu çalışma için Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Komisyonundan onay alınmıştır (31.01.2012 tarih-03 sayılı kurul toplantısı).

3.2.FFPE Gömülü Doku Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu

FFPE doku örneklerinde genomik DNA izolasyonu ticari kit (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) kullanılarak gerçekleştirildi. DNA izolasyon kitinin çalışma prensibi üretici firmanın belirttiği şekilde aşağıdaki basamakları içermektedir:

3.2.1. Genomik DNA İzolasyon Protokolü

Deparafinizasyon:

- 1) FFPE doku örneklerinin etrafında bulunan fazla parafin, steril bistüri ve pens yardımı ile mekanik olarak uzaklaştırıldı ve bu doku örnekleri steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.
- 2) Örnekler 56°C’de etüvde (Nüve) 16-18 saat süreyle gece boyu inkübasyona bırakıldı.
- 3) Örnekler deparafinizasyon amacı ile 1200 µl ksilen (Sigma-Aldrich) ilave edildi ve 2.200 rpm’de kuvvetlice vortekslendi (10 kez pulse-vorteks).
- 4) Örnekler 14.000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant pelet kısmına dokunulmadan mikropipet kullanılarak uzaklaştırıldı.
- 5) Ksilenle deparafinizasyon işlemi (3-4. basamaklar) 1 kez daha tekrarlandı.
- 6) Doku örneklerinde artık olarak kalan ksileni uzaklaştırmak için peletlere 1200 µl etanol (Merck) (%96-100) eklendi ve örnekler birkaç kez pulse-vorteks edildi.
- 7) Örnekler oda ısısında (15-25°C), 14.000 rpm’de, 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldı (Peletin dağılmamasına dikkat edildi).
- 8) Altıncı ve yedinci basamaklar tekrar edildi. Örneklerin bulunduğu mikrosantrifüj tüplerinin kapakları açılarak 37°C’ye ayarlı etüvde, 15 dk inkübasyona bırakılarak, rezidüe etanolün tamamen uzaklaşması sağlandı.
- 9) Örnekler kitle birlikte sağlanan 180 µl doku lizis tamponunda (Buffer ATL) süspanse edildi. Üzerine 20 µl proteinaz K eklendi ve vortekslenerek homojenize edildi. Homojenat dokunun tamamen lize olması için 56°C’ye ayarlı su banyosunda 16-18 saat (gece boyunca) inkübasyona bırakıldı.
- 10) Örnekler, kitle birlikte sağlanan 200 µl “AL Tamponu” eklendi ve 70°C’de 10 dk inkübasyona bırakıldı.
- 11) Örnekler, 200 µl “Etanol” (%96-100) eklendi ve homojenize edildi.

12) Örnekler kitle birlikte sağlanan spin kolonlara aktarıldı. Kolonların kapakları kapatılarak, 8.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.

13) Santrifüj işleminden sonra kolonlar yeni 2 ml'lik toplama tüplerine yerleştirildi. Kolonlara kitle birlikte sağlanan 500 µl yıkama tamponu (AW1 Tamponu) eklendi. Kolonların kapakları kapatılarak 8.000 rpm'de, 1 dk santrifüj edildi.

14) Santrifüjden sonra kolonlar, yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Kolonlara kitle birlikte sağlanan 500 µl yıkama tamponu (AW2 Tamponu) eklendi. Kolonların kapakları kapatılarak 14.000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi.

15) Kolonlar yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.

16) Santrifüj işleminden sonra kolonlar, yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve kolonlara kitle birlikte sağlanan 100 µl elüsyon tamponu (AE Tamponu) eklendi. Oda ısısında (15-25⁰C) 5 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon işleminden sonra kolonlar 8.000 rpm'de, 1 dk santrifüj edilerek genomik DNA örnekleri elde edildi.

Örnekler, bir sonraki analiz aşamasına kadar -20⁰C'de saklandı.

3.3.Genomik DNA Örneklerinin Konsantrasyonlarının ve Saflık Derecelerinin Belirlenmesi

Toplam 80 adet doku örneklerinden izole edilen DNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflıkları, spektrofotometrik yöntemle (Thermo Scientific NanoDrop 2000) belirlendi. Her bir olguya ait DNA örneğinden 2µl alınarak cihazda okuma yapıldı ve örneklere ait konsantrasyon, A₂₆₀, A₂₈₀, A_{260/280} değerleri kaydedildi.

3.4.Bisülfid Uygulaması

Metilasyona özgün gerçek-zamanlı PCR uygulamasından önce, izole edilen DNA örneklerinde bisülfid uygulaması yapıldı. Bu amaçla ticari kit (EZ DNA Methylation-Gold Kit, Zymo Res.) kullanıldı ve aşağıdaki basamaklar sırası ile uygulandı:

3.4.1. Ön Hazırlık Aşamaları

Kitle birlikte liyofilize halde sağlanan CT dönüşüm reagenti aşağıda belirtildiği şekilde kullanıma hazır hale getirildi:

- CT dönüşüm reagent tüpüne sırasıyla 900 µl dH₂O, 300µl M-dilüsyon tamponu ve 50µl M-dissolving tamponu ilave edildi.
- Oda ısısında 10 dk boyunca vortekslendi.

Kitle birlikte sağlanan M-yıkama tamponuna 24 ml etanol (%96-100) eklenerek kullanıma hazır hale getirildi.

3.4.2. Bisülfid Uygulama Protokolü

1) Bir PCR tüpüne 20µl DNA örneği (DNA konsantrasyonu 500ng olarak ayarlandı) ve 130µl CT dönüşüm reagenti eklendi. Mikropipet yardımı ile karıştırılarak kısa bir santrifüj işlemi (short-spin) yapıldı.

2) Örnekler thermal cycler'a (Nyx Technik, Inc. USA) yerleştirildi ve 98°C'de 10 dk, 64°C'de 2.5 saat, 4°C'de bekletme olmak üzere program ayarlandı.

3) Kitle birlikte sağlanan spin kolonlar, toplama tüplerine yerleştirildikten sonra üzerlerine 600 µl M-bağlanma tamponu eklendi.

4) İçinde M-bağlanma tamponu bulunan kolonlara, 2. basamak sonrasında elde edilen DNA örnekleri eklendi. Kolonların kapakları kapatılarak birkaç defa ters yüz edilerek karıştırıldı.

5) Örnekler 14.000 rpm'de 30sn santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, toplama tüpünde toplanan içerik uzaklaştırıldı.

6) Kolonlara 100µl M-yıkama tamponu koyularak 14.000rpm'de 30sn santrifüj edildi.

7) Kolonlara 200µl M-desülfonasyon tamponu eklendi ve oda ısısında (20-30°C) 15-20dk inkübe edildikten sonra 14.000rpm'de 30sn santrifüj edildi.

8) Kolonlara 200µl M-yıkama tamponu koyuldu ve 14.000rpm'de 30sn santrifüj edildi.

9) Kolonlar toplama tüplerinden alınarak steril 1.5ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve üzerlerine 12µl M-elüsyon tamponu eklenerek 14.000rpm'de 30sn santrifüj edildi.

Bisülfid uygulaması yapılan DNA örnekleri, bir sonraki aşamaya kadar -20°C'de saklandı.

3.5.Metilasyona-Özgün Yüksek Çözünürlüklü Erime (High Resolution Melting, HRM) Analizi

GADD45γ promoter metilasyon durumu, gerçek-zamanlı PCR sistemi (LightCycler 480 Gerçek-zamanlı PCR Sistemi, Roche Diagnostics) kullanılarak belirlendi. HRM analizi öncesinde, bisülfid modifikasyonları tamamlanmış DNA örnekleri kullanılarak *GADD45γ* genine özgün 115bp büyüklüğündeki promoter bölgenin polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu gerçekleştirildi. Amplifikasyonda kullanılan primer setinin dizilimleri Tablo 3.1'de yer almaktadır (Zhang vd 2010). Amplifikasyon sonrasında, ampikonun identifikasyonu amacı ile HRM analizi yapıldı.

Tablo 3.1 *GADD45γ* promoter metilasyon düzeyinin belirlenmesinde kullanılan primer setine özgün dizilimler (5'→3')

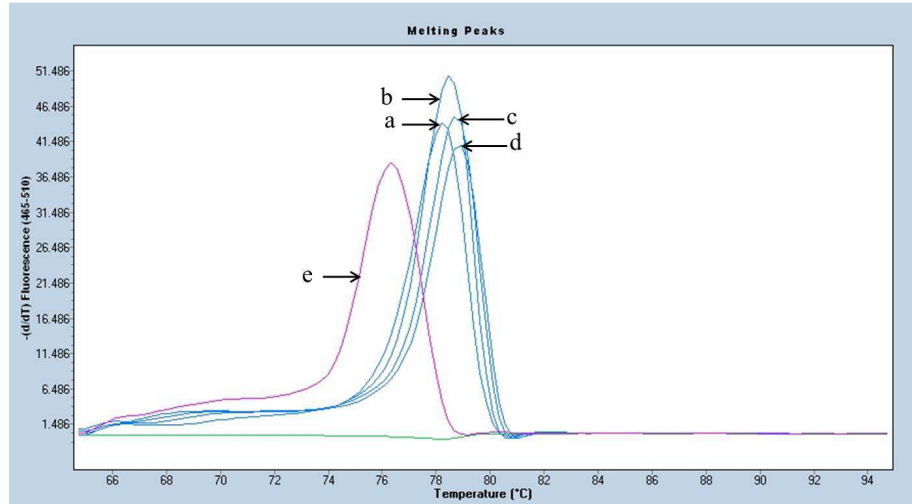
<i>GADD45γ</i> Primer seti
5'-CGTCGTGTTGAGTTTTGGT-3' (Forward)
5'-TAACCGCGAACTTCTTCCA-3' (Reverse)

3.5.1. Gerçek-Zamanlı PCR Optimizasyon Çalışmaları

Hedef bölgenin amplifikasyonu için uygulanacak protokolün optimizasyon çalışmaları;

- i) Bisülfid uygulaması yapılmış tamamıyla metile genomik kontrol DNA örneği,
- ii) Bisülfid uygulaması yapılmış tamamıyla metile-olmayan genomik kontrol DNA örneği ve
- iii) Bisülfid uygulaması yapılmamış metile-olmayan genomik kontrol DNA örnekleri

kullanılarak yapıldı (EpiTect Control DNA and Control DNA Set, Qiagen). Optimizasyon çalışmalarına 1.5mM, 2mM, 2.5mM ve 3mM olmak üzere 4 farklı MgCl₂ konsantrasyonları kullanılarak devam edildi. En iyi sonucun elde edildiği 3mM MgCl₂ konsantrasyonu ile çalışmalara devam edildi (Şekil 3.1). Tablo 3.2 ve 3.3'te optimize edilen gerçek-zamanlı PCR reaksiyon karışımı ve PCR protokolü yer almaktadır.



Şekil 3.1 Farklı MgCl₂ konsantrasyonu kullanılarak yapılan optimizasyon çalışmasına ait metilasyona-özgün yüksek çözünürlüklü erime eğrisi analizi (HRM). a) 1,5 mM MgCl₂ ve metile DNA örneği, b) 2mM MgCl₂ ve metile DNA örneği, c) 2,5mM MgCl₂ ve metile DNA örneği, d) 3mM MgCl₂ ve metile DNA örneği e) 3mM MgCl₂ ve metile-olmayan DNA örneği.

Tablo 3.2 *GADD45γ* promoter metilasyon durumunu belirlemek amacı ile kullanılan gerçek-zamanlı PCR reaksiyon karışımı

İçerik	Hacim	Final
Forward primer	1 µl	5 µM
Reverse primer	1 µl	5 µM
MgCl ₂	2.4 µl	3 mM
Master karışımı*	10 µl	1x
PCR-grade su	0.6 µl	-
Template DNA	5 µl	-

*: Master karışımı olarak, "LightCycler 480 HRM Master Mix" kiti (Roche) kullanıldı.

Tablo 3.3 GADD45 γ için Metilasyon-özgün HRM Analiz Protokolü*

Analiz Modu	Döngü	Segment	Hedef Isı	Süre	Kazanım Modu
Pre-inkübasyon					
	1		95 °C	10 dk	-
Amplifikasyon					
	50	Denatürasyon	95 °C	10 sn	-
		Annealing	60 °C	15 sn	Tek
		Ekstensiyon	72 °C	10 sn	-
HRM					
	1	Denatürasyon	95 °C	1 dk	-
		Annealing	40 °C	1 dk	-
		Melting	95 °C	0 sn	Sürekli
slope=0.3°C/sn					
Soğutma					
	1		40 °C	30 sn	-

*: Gerçek-zamanlı PCR Protokolü; **Pre-inkübasyon:** Enzim aktivasyonu ve kalıp DNA'nın denatürasyonu, **Amplifikasyon:** Hedef bölgenin primerler yardımı ile çoğaltılması, **HRM:** Satüre boya ve HRM master karışımı kullanılarak hedef bölgenin (amplikonun) identifikasyonu, **Soğutma:** Sistemde yer alan termal bloğun soğutulması basamaklarını içermektedir.

3.6. İmmünohistokimyasal (İHK) Analiz

İmmünohistokimyasal analiz için FFPE dokulardan elektrostatik yüklü lamlara (X-traTM, Surgipath Medical Industries, Richmond, Illinois, USA) 4-5 μ m kalınlığında kesitler alındı ve 60°C'de en az iki saat kurutuldu. Deparafinizasyon ve antijen açığa çıkarma işlemleri de dahil olmak üzere tüm boyama süreci Ventana, BechMark XT tam otomatik İHK boyama cihazında gerçekleştirildi. Zıt boyama Hematoksilin ve mavileştirici solüsyon ile cihazda tamamlandı. Kesitlerin dehidratasyonu, ksilen ile şeffaflandırılmaları ve lamel ile kapatılma aşamaları elde yapılarak İHK boyama protokolü tamamlandı. Primer antikor olarak Bcl-2 (dilüsyon: 1/25, klon: 100/D5, Santa Cruz, Heidelberg, Germany), Bcl-x_L (dilüsyon: 1/50, klon: 2H12, Santa Cruz, Heidelberg, Germany) ve GADD45 γ (dilüsyon: 1/200, Rabbit Polyclonal Antibody, Woburn, MA, USA) kullanıldı.

Işık mikroskopunda, x40 büyütmede immünopozitif hücreleri içeren alanlar tarandı. Bcl-2, Bcl-x_L proteinleri için pozitif ekspresyon, neoplastik hücrelerin en az %10'u pozitif olduğunda kabul edildi (Bai vd 2004). GADD45 γ proteini için pozitif ekspresyon, granüler sitoplazmik boyanma olduğunda kabul edildi. Ayrıca Gadd45 γ için pozitif ekspresyon 4 gruba ayrılarak değerlendirildi: 0: boyanma yok, +: zayıf

boyanma, ++: moderate (orta şiddette) boyanma, +++: güçlü boyanma (Na vd 2009). Tonsil, Bcl-2 ve Bcl-x_L için; larinks skuamoz hücreli karsinom, GADD45 γ için pozitif kontrol olarak kullanıldı. Aynı doku örnekleri, aynı immünohistokimyasal yöntemlerle primer antikor ilave edilmeksizin boyanarak negatif kontrol olarak değerlendirildi.

3.7. TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling) Yöntemi

GADD45 γ 'nın hücreyi apoptoza yönlendirip yönlendirmediğini değerlendirmek amacıyla TUNEL yöntemi uygulandı. Bu amaçla, FFPE dokulardan elektrostatik yüklü lamlara (X-traTM, Surgipath Medical Industries, Richmond, Illinois, USA) alınan 4 μ m kalınlığında kesitlerde DNA fragmantasyonunun gösterilmesi için, TdT (terminal deoksinukleotidil-transferaz)-aracılı *in situ* işaretleme tekniği (TUNEL) kullanıldı (In Situ Cell Death Detection Kit, POD, Roche). Üretici firmanın önerdiği şekilde uygulanan protokolün detayları aşağıda basamaklar halinde verilmektedir:

A. Deparafinizasyon

1. Lamlar etüvde 60°C'de 30dk inkübasyona bırakıldı.
2. Etüvden çıkartılan lamlar ksilende oda sıcaklığında 2 saat bekletildi.

B. Rehidratasyon

1. Lamlar sırasıyla %100, %95, %90, %80 ve %70'lik etanol içerisinde 3'er dk bekletildi.
2. Lamlar iki ayrı PBS (pH 7,4) içerisinde oda sıcaklığında 3'er dk bekletilerek yıkama işlemi gerçekleştirildi.

C. H₂O₂ ile bloklama

1. Lamların üzerine pipetle %3'lük H₂O₂ solüsyonu damlatıldı ve oda sıcaklığında 15dk inkübe edildi.
2. Lamlar iki ayrı PBS (pH 7,4) içerisinde oda sıcaklığında 3'er dk bekletilerek yıkama işlemi gerçekleştirildi.

D. Proteaz Uygulaması

1. Lamlar %1'lik proteinaz K içeren 10 mM Tris-HCl'de 37°C'de 30 dk inkübe edildi.
2. Lamlar dört ayrı PBS (pH 7,4) içerisinde oda sıcaklığında 3'er dk bekletildi.
3. Lamlar, üzerindeki doku örneği nemli kalacak şekilde kurutma kağıdı ile kurutuldu.

E. TUNEL Karışımının eklenmesi

1. Örneklerin üzerine kitle birlikte sağlanan 50µl TUNEL reaksiyon karışımı eklendi ve üzeri lamelle kapatılıp 37°C’de nemli ve karanlık ortamda 1 saat inkübasyona bırakıldı.
2. Lamlar üç ayrı PBS (pH 7,4) içerisinde oda sıcaklığında 2’şer dk bekletildi.
3. Lamlar, üzerindeki doku örneği nemli kalacak şekilde kurutma kağıdı ile kurutuldu.

F. Converter-POD Eklenmesi

1. Doku örneği üzerine kitle birlikte sağlanan Converter-POD’tan 50µl eklendi ve lamelle kapatılıp 37°C’de nemli ve karanlık ortamda 30dk inkübe edildi.
2. Lamlar üç ayrı PBS (pH 7,4) içerisinde oda sıcaklığında 2’şer dk bekletildi.
3. Lamlar, üzerindeki doku örneği nemli kalacak şekilde kurutma kağıdı ile kurutuldu.

G. DAB-Substrat Eklenmesi

1. Kitle birlikte sağlanan peroksidaz buffer içerisinde %5’lik DAB-Substrat hazırlandı ve doku örneklerini üzerine 100 µl eklendi. Oda sıcaklığında 10 dk bekletildi.
2. Lamlar üç ayrı PBS (pH 7,4) içerisinde oda sıcaklığında 2’şer dk bekletildi.
3. Örnekler Harris’in hemotoksilen boyası ile zıt boyama yapıldı ve üzerleri lamelle kapatıldı.

Her TUNEL protokolü uygulandığında, çalışma grubu örnekleri ile birlikte pozitif kontrol (normal timik doku örnekleri) ve negatif kontrol (TUNEL reaksiyon karışımı eklenmemiş reaktif lenf nodülü kesitleri) kullanıldı. Işık mikroskopunda, DBBHL olgu ve RLD’li kontrol gruplarına ait preparatlarda, x40 büyütmede apoptotik hücreleri içeren en az 10 alan sayıldı ve apoptotik hücre oranı aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Garrity vd 2003):

$$\text{Apoptotik hücre oranı (\%)} = \frac{\text{Pozitif apoptoz hücre sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times \%100$$

3.7.İstatistiksel Analiz

Tüm analizler için SPSS programı kullanılarak χ^2 testi yapıldı. (version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) ve $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1. Çalışma Grubunu Oluşturan Olgulara Ait Klinikopatolojik Parametreler

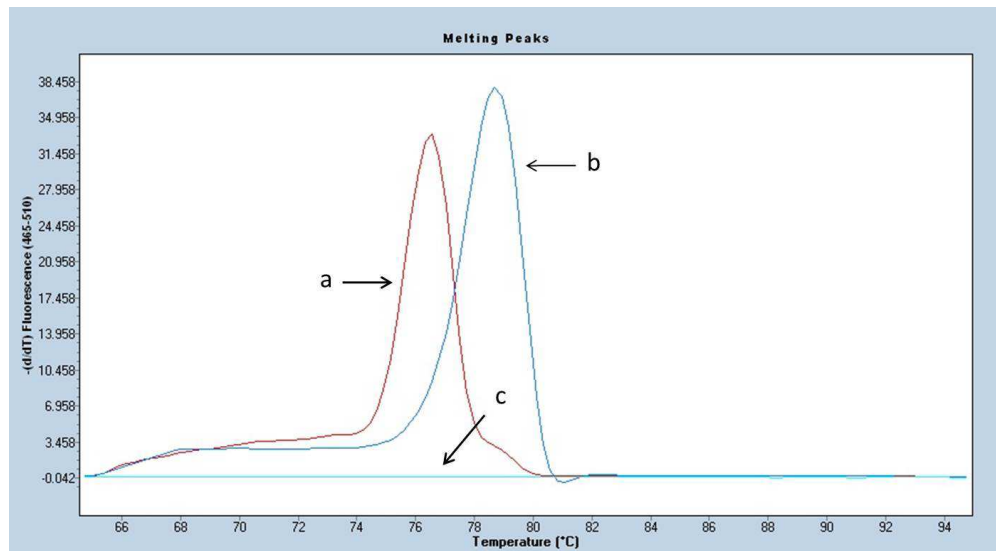
Bu çalışmada, 40 adet nodal/ekstra nodal yerleşimli DBBHL doku örnekleri ile kontrol grubu olarak 40 adet RLD örnekleri değerlendirildi. DBBHL olgularında ortalama yaş 61.7 ± 15.82 (24-80) olarak bulundu. Kontrol grubunu oluşturan olguların ortalama yaşı ise 32.68 ± 22.27 (1-79) olarak belirlendi. DBBHL'li olguların 22 (%55)'sini kadın ve 18 (%45)'ini erkek hasta oluştururken malign olmayan RLD'li doku örneklerinin 12 (%30)'si kadın ve 28 (%70)'i erkek hastadan elde edildi. DBBHL'li doku örneklerinin 15 (%38.4)'inde nodal ve 24 (%61.6)'ünde extranodal tutulum belirlendi (1 olgunun tutulumu belirlenememiştir). DBBHL tanısı alan olgular klinik evrelerine göre değerlendirildiğinde, tüm olgular erken evre (Evre I ve evre II) ve ileri evre (Evre III ve evre IV) olmak üzere gruplandırıldı. DBBHL olgularından 5'inde klinik evre verilerine ulaşamadı. Geride kalan 35 olgudan 9'unun (%25.7) erken evre ve 26'sının (%74.3) ileri evre olduğu belirlendi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. DBBHL'li olgulara ait klinikopatolojik parametreler

Klinikopatolojik parametreler	Olgu sayısı (%)
Ortalama yaş (En düşük-En yüksek)	61.7 ± 15.82 (24-80)
Cinsiyet	
Kadın	22 (55.0)
Erkek	18 (45.0)
Klinik evre	
Evre I	4 (11.4)
Evre II	5 (14.3)
Evre III	13 (37.15)
Evre IV	13 (37.15)
Tutulum	
Nodal	15 (38.4)
Ekstranodal	24 (61.6)

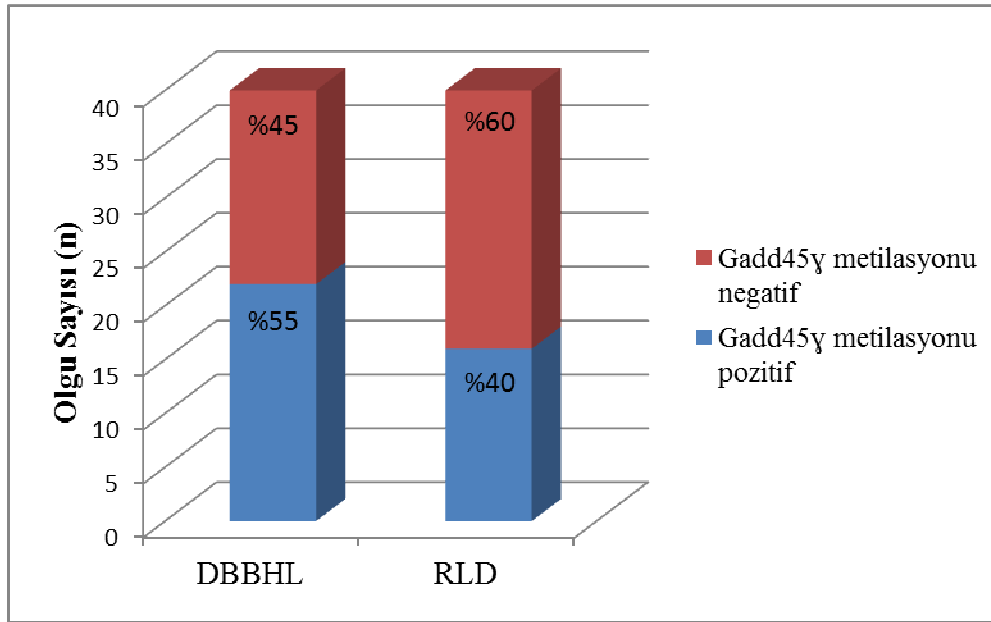
4.2. Çalışma Grubunu Oluşturan Olgularda *GADD45γ* Metilasyon Durumu

GADD45γ geninin promoter metilasyon durumu, çalışma grubumuzu oluşturan olgulara ait FFPE dokulardan izole edilen genomik DNA örneklerinde, metilasyona özgün HRM analizi ile belirlendi. Şekil 4.1’de DBBHL olgularına ait HRM analizi gösterilmektedir.



Şekil 4.1 DBBHL olgularında *GADD45γ* promoter metilasyonuna özgün HRM analizi. a: Promoter metilasyonu belirlenmeyen olguya ait erime eğrisi ($T_m=76\pm0.5^\circ\text{C}$), b: Promoter metilasyonu belirlenen olguya ait erime eğrisi ($T_m=79\pm0.5^\circ\text{C}$), c: Negatif kontrol (Kalıp DNA yerine PCR-grade su kullanıldı).

Tüm olgulardan informatif veriler alındı. HRM analizi sonrasında metile *GADD45γ* promoter bölgesine sahip örneklerin T_m derecesi $79\pm0.5^\circ\text{C}$ iken, metile olmayan örneklerde T_m derecesi $76\pm0.5^\circ\text{C}$ olarak belirlendi. Buna göre DBBHL olgularından 22 (%55)’inde *GADD45γ* promoter bölgesinin metile olduğu belirlendi. Geriye kalan 18 (%45) olguda ise promoter metilasyonu gözlenmedi. Kontrol grubu olgularından 16 (%40)’sında *GADD45γ* promoter metilasyonu saptanırken, 24 (%60) olguda *GADD45γ* promoter bölgesinin metile olmadığı belirlendi (Şekil 4.2). *GADD45γ* metilasyonu açısından DBBHL’li olgular ve kontrol grubu olgular arasında anlamlı bir fark gözlenmedi ($P= 0.263$).



Şekil 4.2 Diffüz Büyük B-hücreli Lenfoma (DBBHL) ve Reaktif Lenfoid Doku (RLD) örneklerinde *GADD45γ* promoter metilasyon sıklıkları

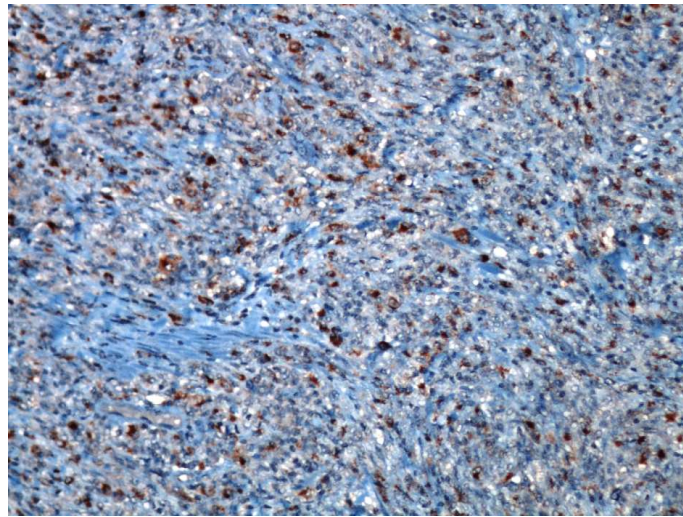
GADD45γ promoter metilasyon durumu ve olguların klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi değerlendirildiğinde, cinsiyet ve tutulum arasında anlamlı bir ilişki belirlenmedi (sırası ile $P= 1.000$ ve $P= 0.086$). Erken evre olgularla karşılaştırıldığında ise, ileri evre olgularda metilasyon sıklığı 17 kat daha yüksekti ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($P= 0.041$) (Tablo 4.2).

Tablo 4.2 DBBHL’de *GADD45γ* metilasyon durumunun klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi

Klinikopatolojik parametre	<i>GADD45γ</i> metilasyon durumu		<i>P</i> -değeri
	Metile (%)	Unmetile (%)	
Cinsiyet			
Kadın	11 (50)	11 (50)	<i>1.000</i>
Erkek	9 (50)	9 (50)	
Klinik evre			
Erken	1 (12.5)	7 (87.5)	<i>0.041</i>
İleri	17 (60.7)	11 (39.3)	
Tutulum			
Nodal	8 (36.4)	14 (63.6)	<i>0.086</i>
Ekstranodal	10 (71.4)	4 (28.6)	

4.3. GADD45 γ Protein Ekspresyonu ve Metilasyon Profili ile İlişkisi

GADD45 γ protein ekspresyonu açısından DBBHL olgularının 2'si "0", 20'si "+", 12'si "++" ve 6'sı "+++" olarak değerlendirilirken, RLD'li 8 olgu "0", 30 olgu "+", 2 olgu "++" olarak değerlendirildi (Şekil 4.3). Bu değerlendirmede "0" ve "+" olgular protein ekspresyonu açısından negatif ve "++" ve "+++" olgular protein ekspresyonu açısından pozitif olarak gruplandırıldığında, DBBHL tanısı alan 22 (%55) olguda GADD45 γ protein ekspresyonu gözlenmezken, 18 (%45) olguda GADD45 γ protein ekspresyonu gözlemlendi. RLD'li olguların 38'i (%95) protein ekspresyonu açısından negatif olarak değerlendirilirken, 2 (%5) olgu protein ekspresyonu açısından pozitif olarak değerlendirildi. DBBHL'li ve RLD'li olgular arasında GADD45 γ protein ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.000$) (Tablo 4.3).



Şekil 4.3 DBBHL'li olguda GADD45 γ proteininin güçlü (+++) ekspresyonu (x200).
(Tümör hücrelerinde yoğun sitoplazmik boyanma)

Tablo 4.3 DBBHL'li ve RLD'li olgularda GADD45 γ protein ekspresyonu

GADD45 γ ekspresyonu	DBBHL (%)	RLD (%)	<i>P</i> değeri
Negatif (0 / +)	22 (55)	38 (95)	0.000
Pozitif (++ / +++)	18 (45)	2 (5)	

GADD45 γ protein ekspresyonu DBBHL'li olguların patolojik evrelerine göre değerlendirildiğinde, erken evre olguların 5 (%62.5)'sında ekspresyon gözlenmezken, 3 (%37.5) olguda protein ekspresyonu gözlemlendi. İleri evre olgularda ise, 14 (%50) olgu ekspresyon açısından negatif olarak değerlendirilirken, 14 (%50) olgu pozitif olarak değerlendirildi. Klinik evre ve protein ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmedi ($P=0.695$). Benzer şekilde, cinsiyet ve tutulum arasında da anlamlı bir ilişki belirlenmedi (sırası ile $P= 0.75$ ve $P= 0.495$) (Tablo 4.4).

Tablo 4.4 DBBHL'de GADD45 γ protein ekspresyonunun klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi

Klinikopatolojik parametre	GADD45 γ protein ekspresyonu		P-değeri
	Pozitif (%)	Negatif (%)	
Cinsiyet			
Kadın	9 (59.1)	13 (40.9)	0.75
Erkek	9 (50)	9 (50)	
Klinik evre			
Erken	3 (37.5)	5 (62.5)	0.695
İleri	14 (50)	14 (50)	
Tutulum			
Nodal	9 (40.9)	13 (59.1)	0.495
Ekstranodal	8 (71.4)	6 (28.6)	

GADD45 γ promoter metilasyon profili ile protein ekspresyonu arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, toplam 38 (%47.5) olguda uyum gözlenirken 42 (%52.5) olguda metilasyon durumu ve protein ekspresyonu arasında uyum belirlenmedi (Tablo 4.5).

Tablo 4.5 GADD45 γ promoter metilasyonu ile protein ekspresyonu arasındaki ilişki

	Metilasyon + / Ekspresyon +	Metilasyon + / Ekspresyon -	Metilasyon - / Ekspresyon +	Metilasyon - / Ekspresyon -
DBBHL	10	12	8	10
RLD	0	16	2	22
Toplam	10	28	10	32

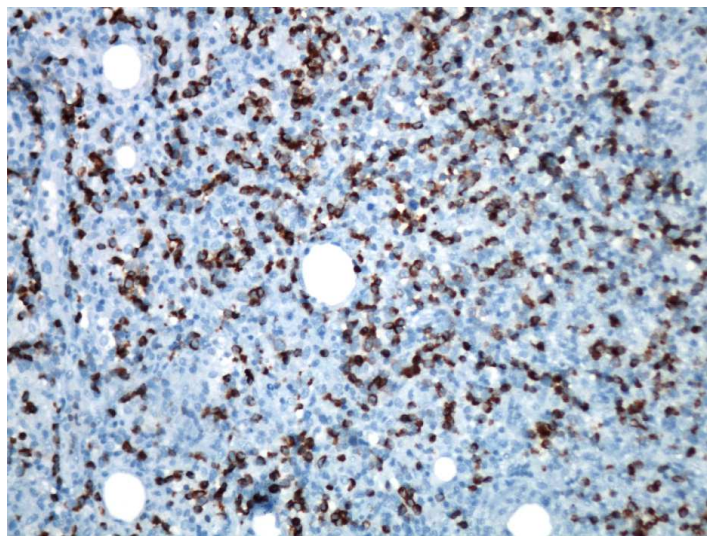
4.4. Apoptotik parametreler ve *GADD45* γ Metilasyon Profili ile İlişkileri

4.4.1. Bcl-2 ve Bcl-x_L Protein Ekspresyonu

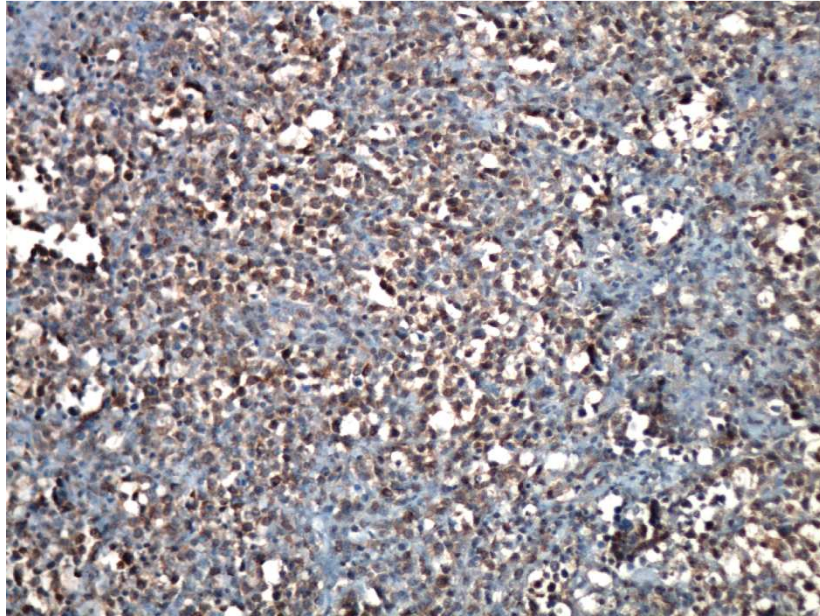
Tablo 4.6, DBBHL'li ve RLD'li olgularda gözlenen Bcl-2 ve Bcl-x_L protein ekspresyon profillerini göstermektedir. DBBHL'li olgularının 37 (%92.5)'sinde Bcl-2 ekspresyon kaybı gözlenirken, 3 (%7.5)'ünde Bcl-2 ekspresyonu gözlendi (Şekil 4.4). RLD'li olguların 3 (%7.5)'ünde Bcl-2 ekspresyon kaybı ve 37'sinde Bcl-2 ekspresyonu gözlendi. DBBHL olgularıyla RLD örneklerinin arasında Bcl-2 ekspresyonu açısından fark, istatistiksel olarak anlamlı idi ($P=0.000$). Bcl-x_L ekspresyonu açısından DBBHL olgularının 33 (%82.5)'ü pozitif olarak değerlendirilirken, RLD'li olguların 38 (%95)'i pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 4.5). DBBHL olguları ile RLD'li olgular arasında Bcl-x_L protein ekspresyonları açısından anlamlı bir ilişki bulunamadı ($P=0.154$).

Tablo 4.6 DBBHL'li ve RLD'li olgularda anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonları

	DBBHL (%)	RLD (%)	<i>P</i> -değeri
Bcl-2			
Negatif	37 (92.5)	3 (7.5)	0.000
Pozitif	3 (7.5)	37 (92.5)	
Bcl-x _L			
Negatif	7 (17.5)	2 (5)	0.154
Pozitif	33 (82.5)	38 (95)	



Şekil 4.4 DBBHL'li olguda Bcl-2 proteininin güçlü (+++) ekspresyonu (x200).



Şekil 4.5 DBBHL'li olguda Bcl- x_L proteininin güçlü (+++) ekspresyonu (x200).

4.4.2. Bcl-2/ Bcl-x_L Protein Ekspresyonları ve *GADD45γ* Metilasyonu

DBBHL'li olgular arasında, Bcl-2 ekspresyonunun gözleendiği toplam 3 olguda *GADD45γ* promoter metilasyonu gözlenmedi. Bcl-2 ekspresyon kaybı olan toplam 37 olgudan 20 (%54.1)'sinde *GADD45γ* promoter metilasyonu gözlendi (Tablo 4.7). *GADD45γ* promoter metilasyonu ve Bcl-2 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlam bulunamadı ($P=0.231$). Bcl-x_L ekspresyonu açısından pozitif olarak değerlendirilen toplam 33 olgunun 16'sında (%48.5) *GADD45γ* promoter bölgesi metile olarak belirlendi. Bcl-x_L ekspresyon kaybı gözlenen 7 olgunun sadece 4'ünde (%57.1) *GADD45γ* promoter metilasyonu saptandı. *GADD45γ* promoter metilasyonu ve Bcl-x_L ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlam bulunamadı ($P=1.000$).

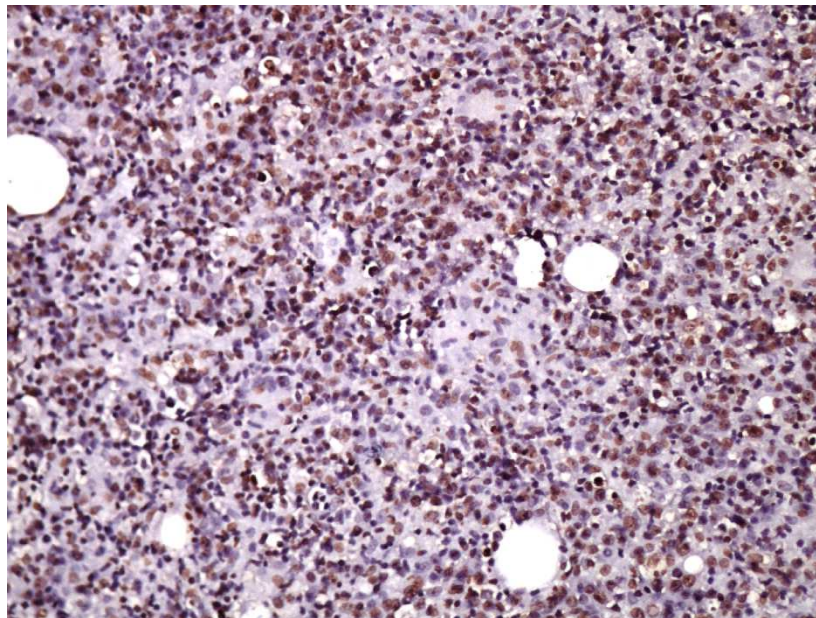
RLD'li olgularda ise, *GADD45γ* promoter metilasyonunun gözleendiği tüm olguların (n=16) aynı zamanda Bcl-2 ekspresyonu açısından da pozitif oldukları belirlendi. *GADD45γ* promoter'ı unmetile olan toplam 24 olgunun 21'inde (%87.5) Bcl-2 ekspresyonu pozitif olarak belirlendi. Bcl-x_L ekspresyonu gözönüne alındığında, *GADD45γ* promoter metilasyonu gözlenen 16 olgunun tümünde Bcl-x_L ekspresyonu gözlenirken *GADD45γ* promoter metilasyonu gözlenmeyen 24 olgunun 22 (%91.7)'sinde Bcl-x_L ekspresyonu gözlendi. RLD'li olgularda *GADD45γ* promoter metilasyon durumu ile Bcl-2 ve Bcl-x_L ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki belirlenmedi (sırası ile $P=0.262$ ve $P=0.508$).

Tablo 4.7 DBBHL’de anti-apoptotik protein ekspresyonları ve *GADD45*γ metilasyonu arasındaki ilişki

Apoptotik parametreler	<i>GADD45</i> γ metilasyon durumu		<i>P</i> -değeri
	Metile (%)	Unmetile (%)	
Bcl-2 ekspresyonu			
Pozitif	-	3 (100)	0.231
Negatif	20 (54.1)	17 (45.9)	
Bcl-x_L ekspresyonu			
Pozitif	16 (48.5)	17 (51.5)	1.000
Negatif	4 (57.1)	3 (42.9)	

4.4.3. Apoptotik İndeks (AI) ve *GADD45*γ, Bcl-2, Bcl-xL protein ekspresyonları arasındaki ilişki

DBBHL’li olgularda, TUNEL pozitif apoptotik hücre indeksi medyan değeri 0.6 (%95 güven aralığı, aralık 0-1) iken, RLD’li olgularda bu değer 0.5 (%95 güven aralığı, aralık 0-1) olarak belirlendi. Şekil 4.6’da DBBHL’li bir olguya ait doku kesitinde TUNEL yöntemi ile boyanan apoptotik hücreler görülmektedir.



Şekil 4.6 DBBHL’da TUNEL yöntemi ile boyanan apoptotik hücreler (x200).

Çalışmaya dahil edilen tüm olgulardaki AI değerleri “< 0.5” ve “≥ 0.5” olmak üzere 2 alt grupta toplandı. DBBHL ve kontrol grubu olgularda belirlenen AI değerleri GADD45 γ , Bcl-2 ve Bcl-x_L protein ekspresyonları ile karşılaştırıldığında, iki grup arasında her 3 protein ekspresyonu açısından anlamlı bir ilişki bulunmadı. GADD45 γ protein ekspresyonu pozitif olarak değerlendirilen DBBHL ve kontrol grubu olgularında AI değerleri sırası ile 0.65 ve 0.72 olarak belirlenirken, ekspresyon kaybı olan olgularda bu değerlerin sırası ile 0.6 ve 0.5 oldukları belirlendi. Bcl-2 protein ekspresyon kaybı olan DBBHL’li ve RLD’li olgularda AI sırasıyla 0.6 ve 0.5 olarak belirlenirken, Bcl-2 ekspresyonu gözlenen DBBHL’li olgularda AI 0.45 iken, RLD’li olgularda AI 0.5 olarak belirlendi. Bcl-x_L ekspresyon kaybı olan DBBHL’li ve RLD’li olgularda AI sırası ile 0.2 ve 0.47 olarak belirlenirken, bu proteinin eksprese olduğu olgularda AI değerleri sırası ile 0.8 ve 0.5 olarak hesaplandı (Tablo 4.8).

Tablo 4.8 DBBHL’li ve RLD’li olgularda AI ile GADD45 γ , Bcl-2 ve Bcl-x_L protein ekspresyonları arasındaki ilişki

	DBBHL’de Apoptotik İndeks (medyan/aralık)	<i>P</i> -değeri	RLD’de Apoptotik İndeks (medyan/aralık)	<i>P</i> -değeri
GADD45 γ				
Negatif	0.6/0-1	1.000	0.5/0-1	0,492
Pozitif	0.65/0-1		0.72/0-1	
Bcl-2				
Negatif	0.6/0-1	1.000	0.5/0-1	1.000
Pozitif	0.45/0-1		0.5/0-1	
Bcl-x _L				
Negatif	0.2/0-1	0.095	0.47/0-1	1.000
Pozitif	0.8/0-1		0.5/0-1	

4.4.4. Apoptotik İndeks ve GADD45 γ promoter metilasyonu arasındaki ilişki

DBBHL’li olgularda promoter metilasyonu belirlenen toplam 22 olgunun 9’unda (%56.2) AI değeri 0.5’ten küçük iken geride kalan 13 olguda bu değer ≤0.5 olarak belirlendi. AI ve GADD45 γ metilasyonu arasında anlamlı bir ilişki belirlenmedi (*P*=1.000) (Tablo 4.9). Kontrol grubunda ise metile olan olguların 7 (%43.8)’sinde ve unmetile olguların 11 (%45.8)’inde AI değerinin <0.5’in altında olduğu belirlendi ve DBBHL’de olduğu gibi anlamlı bir ilişki belirlenmedi (*P*=1.000).

Tablo 4.9 DBBHL’de Apoptotik İndeks ve *GADD45* γ metilasyonu arasındaki ilişki

Apoptotik İndeks (AI)	<i>GADD45</i> γ metilasyon durumu		<i>P</i> -değeri
	Metile (%)	Unmetile (%)	
< 0.5	9 (56.2)	7(43.8)	1.000
\geq 0.5	13 (54.1)	11 (45.9)	

5.TARTIŞMA

Hem fetal hem de erişkin dokularda eksprese edilen GADD45 proteinleri, evrimsel süreçte sıkı korunmuş proteinlerdir. Bu proteinlerin ekspresyonları hücre döngüsünün G₁ fazında artarken, S fazı boyunca önemli derecede azalmaktadır. Temel olarak, GADD45 proteinleri genotoksik ve genotoksik-olmayan ajanlara karşı stres sensörleri ve tümör baskılayıcılar gibi etki göstererek hücre yanıtının oluşmasında rol oynarlar. Ancak uyarının türüne, uyarının etkilediği hücre tipine ve hücrenin içinde bulunduğu fizyolojik koşullara göre fonksiyonları farklılıklar göstermektedir. Günümüze kadar yapılan fonksiyon çalışmalarında, özellikle GADD45 α ve β 'ya odaklanılmış olup, GADD45 γ ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır ve elde edilen verilerin uyumlu olmadığı dikkati çekmektedir (Zerbini vd 2005, Tamura vd 2012, Moskalev vd 2012).

GADD45 proteinlerinin hücrede önemli stres sensörleri olarak görev yapmaları, bu proteinlerin kanser oluşum veya progresyon sürecinde de yer alabileceklerini düşündürmektedir. Bu çalışmanın hipotezlerinden biri *GADD45 γ* 'nin metilasyon aracılı gen ekspresyon kaybının DBBHL'nin patogeneğinde rol oynadığıdır. Bu hipotezin eşliğinde, DBBHL tanısı alan olgularda ve malign olmayan kontrol grubu olgularında *GADD45 γ* metilasyon durumu ve GADD45 γ protein ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışmamızda DBBHL'lı olguların %55'inde *GADD45 γ* promoter metilasyonu belirlenirken, RLD'li olgularda bu oran %40 olarak bulundu. GADD45 γ protein ekspresyonu pozitif olarak değerlendirilen olgu sayısı DBBHL'lı olgularda (n=18) RLD'li olgulara (n=2) oranla 9 kat daha fazla idi ve bu iki çalışma grubu arasında GADD45 γ protein ekspresyonu açısından anlamlı fark görüldü ($P=0.000$).

Literatürde solid tümörlerde ve hematolojik malignensilerde *GADD45 γ* metilasyon durumunu araştıran birçok çalışma bulunmaktadır. Na ve arkadaşlarının (2010) yaptığı bir çalışmada küçük hücre dışı akciğer kanserlerinde *GADD45 γ* metilasyon sıklığı %31.6 olarak bulunmuştur. Ayrıca erkeklere oranla kadınlarda metilasyon sıklığının

daha yüksek olduğu belirlenmiştir ve bu genin metilasyon-aracılı sessizleşmesinin akciğer karsinogenezinde rol oynayabileceği öne sürülmüştür. Bahar ve arkadaşları (2004) hipofiz adenomlu olguların %58'inde *GADD45γ* metilasyonunu belirlemişler ve mRNA düzeyinde gen ekspresyonu gözlenmeyen 22 adenomlu olgunun 18 (%82)'inde hem metilasyon-özgün PCR hem de sodyum bisülfid dizi analizi ile *GADD45γ* metilasyonunu belirlemişlerdir. Ying ve arkadaşları (2005), yüksek-çözünürlüklü bisülfid dizi analizi sonucunda, *GADD45γ*'nin çeşitli kanser türleri ve tümör hücre hatlarında, sıklıkla epigenetik olarak inaktive olduğuna dair bulgular elde etmişlerdir. Söz konusu çalışmada nazofarinks, meme, özofagus, kolorektal, serviks, akciğer, gastrik, larinks karsinomu olmak üzere farklı karsinom hücre hatları ile non-Hodgkin lenfoma, Hodgkin lenfoma ve lösemi hücre hatları olmak üzere 75 farklı karsinom ve lenfoma hücre hatları kullanılmıştır. *GADD45γ* ekspresyonları semi-quantitative RT-PCR kullanılarak analiz edilmiş ve non-Hodgkin lenfomalarda %85, nazofaringeal karsinomda %73, Hodgkin lenfomalarda %50 ve diğer hücre hatlarında %35 oranında *GADD45γ* ekspresyonunun baskılandığı veya susturulduğu bulunmuştur. Bunun aksine *GADD45α* ve *GADD45β* ekspresyonları tüm hücre hatlarında yüksek ekspresyon profili göstermişlerdir. *GADD45γ* ekspresyonunun baskılandığı ya da susturulduğu hücre hatlarının tümünde *GADD45γ* promoter metilasyonu saptanmıştır. Hücre hatlarının yanısıra primer tümörlerin de değerlendirildiği bu çalışmada, endemik Burkitt lenfomada %88, DBBHL'da %38 ve folliküler lenfomada %16 oranında *GADD45γ* metilasyon sıklığı belirlenmiştir. Özetle bu çalışmada, farklı lenfoma türlerinde metilasyon oranı %16-88 oranında değişirken, solid tümörlerde bu oran %11-16 arasında değişkenlik göstermiştir ve bu bulgular lenfomaların hipermetilasyon düzeylerinin solid tümörlere göre anlamlı şekilde yüksek olduğunu göstermektedir. Bu veriler, çalışmamızdan elde edilen verilerle uyumludur. Sonuç olarak, *GADD45γ* solid tümörlerle karşılaştırıldığında lenfomalarda daha yüksek oranda hipermetiledir. Bir başka ifade ile, *GADD45γ* hipermetilasyonu tümör-spesifikliği göstermektedir. Literatürde DBBHL'de klinik örneklerle yapılan tek bir çalışmadan elde edilen verilere ek veri sağlaması, daha geniş serideki olgu ile çalışmanın tamamlanması ve olgu grubunun yanısıra malign olmayan kontrol grubu ile karşılaştırma yapılması açısından, çalışmamızdan elde edilen veriler orijinal nitelik taşımaktadır. Çalışmamızın bir diğer orijinal bulgusu, ileri evre olgularında *GADD45γ* metilasyon sıklığının erken evre

olgulara oranla çok daha yüksek olduğudur. Bu bulgu, bize *GADD45γ* metilasyonunun DBBHL progresyonunda önemli rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

GADD45γ metilasyon durumu ve protein ekspresyonu arasındaki korelasyonu değerlendiren çalışmaların bulguları birbirleriyle uyum göstermemektedir. Ying ve arkadaşlarının farklı kanser hücre hatları ile yaptıkları çalışmalarında, *GADD45γ* ekspresyonunun baskılandığı ya da susturulduğu hücre hatlarının tümünde *GADD45γ* promoter metilasyonu saptanmıştır. Hücre hattı örneklerine yerine hipofiz adenomlu klinik örneklerin değerlendirildiği bir çalışmada, hipofiz adenomlu olguların %58'inde *GADD45γ* metilasyonu belirlenmiş ve mRNA düzeyinde gen ekspresyonu gözlenmeyen 22 adenomlu olgunun 18 (%82)'inde hem metilasyon-özgün PCR hem de sodyum bisülfid dizi analizi ile *GADD45γ* metilasyonu belirlenmiştir. *GADD45γ* metilasyonu ile ekspresyon kaybı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmasına karşın, *GADD45γ* metilasyonu gözlenen olguların %9'unda *GADD45γ* transkriptinin eksprese olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde uyumun gözlenmediği diğer grupta olguların %18'inde *GADD45γ* metilasyonu belirlenmediği halde, ekspresyon gözlenmemiştir (Bahar vd, 2004). Çalışmamızda *GADD45γ* promoter bölgesinde yer alan 115 bp'lik DNA fragmanında metilasyon durumunu değerlendirdi ve DBBHL'de metilasyon sıklığı %55 olarak belirlenirken olguların %45'inde protein aşırı ekspresyonu belirlendi. *GADD45γ* promoter metilasyon durumu ve protein ekspresyonu arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, çalışmamıza dahil edilen olguların %52.5'inde uyum gözlenmedi. Bu olguların 10 tanesi *GADD45γ* promoter metilasyonu ve protein ekspresyonu açısından pozitif olarak değerlendirildi. Promoter metilasyonu negatif olarak değerlendirilen 10 olguda, aynı zamanda protein ekspresyon kaybı da gözlemlendi. Benzer şekilde 22 RLD'li olguda hem promoter metilasyonu hem de protein ekspresyonu negatif olarak değerlendirildi. Bu uyumsuz sonuçlar dört olasılık çerçevesinde açıklanabilir: Birincisi, çalışmamızda metilasyon analizi kantitatif olarak yapılamadığından metilasyon yüzdesi hakkında bilgimiz bulunmamaktadır ve büyük olasılıkla bu olgularda metilasyon yüzdesinin düşük olması, protein ekspresyon kaybı için yetersizdir. İkinci olasılık çerçevesinde, çalışmamızda hedeflenen bölge dışında, DNA metilasyonu aracılığı ile gen baskılanmasından sorumlu olabilecek diğer olası bölgelerin de analiz edilmesi gerektiğini düşünmekteyiz. Tezin kuramsal bilgiler bölümünde yer alan genin yapısı göz önüne alındığında, çalışmamızda değerlendirdiğimiz promoter bölgesi dışındaki diğer kor promoter bölgeleri ile birlikte

ekzon 1-3 ve ekzon 4'ün bir bölümünün (tüm bu alanlar genin CpG adasında yer almaktadır) metilasyon durumunun belirlenmesi gerekliliği açıkça görülecektir. Ayrıca, sözkonusu genin transkripsiyonal sessizleşmesinden sorumlu olabilecek bu hedef bölgelerin bisülfid dizi analizi gibi daha duyarlı ve özgün yöntemlerle değerlendirilmesi, *GADD45γ*'daki DNA metilasyon profili hakkında daha detaylı bilgiler edinmemiz açısından yararlı olacaktır. Primer kanserlerde *GADD45γ* gen mutasyonları nadiren gözlenmektedir (Ying vd 2005). Bu nedenle, üçüncü olasılık, *GADD45γ*'nın epigenetik sessizleşmesinden, DNA metilasyon dışındaki ve/veya DNA metilasyonu ile koordineli çalışan diğer epigenetik mekanizmalar sorumlu olabilir. Son olasılık ise IHK analizinde kullanılan *GADD45* antikorunun poliklonal olmasıdır. Ticari olarak monoklonal antikorun bulunmaması nedeniyle, poliklonal antikor kullanılmıştır. Poliklonal antikorların farklı proteinlerdeki ortak epitoplara tanıyabilmesi, elde edildiği deney hayvanı türüne göre değişkenlik gösterebilmesi ve aynı antijenle yeniden immunize edilen deney hayvanlarında farklı epitoplara sahip olmaları gibi önemli dezavantajları bulunmaktadır (Burry vd 2010).

Zhang ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan bir çalışmada gastrik, kolorektal ve pankreas kanserlerinde *GADD45γ* metilasyon yüzdeleri, promoter metilasyon analizlerinde kullanılan yeni bir yöntem olan HRM analizi (Wojdacz vd 2008) ile değerlendirilmiştir ve *GADD45γ* metilasyon yüzdeleri bu kanserlerde sırasıyla %34, %45 ve %31 olarak belirlenmiştir. Normal dokularda ise metilasyon yüzdesi %10'un altında bulunmuştur. PCR sonrası uygulanan ve bir erime eğrisi analizi yöntemi olan HRM'in en önemli avantajları duyarlı, hızlı ve ucuz bir yöntem olmasıdır. Bu yöntemde DNA'nın PCR ile amplifikasyonu ardından, DNA'ya-bağlanan bir satürasyon boyası varlığında erime eğrisi analizi yapılır ve hedef DNA ampikonunun Tm derecesi belirlenir. HRM analizi, daha detaylı bir erime eğrisi analizidir. Bu amaçla kullanılan yazılım, erime eğrisi normalizasyonu için öncelikle ek ısı değişimi uygular ve sonuçların gözle daha iyi ayırt edilebilmesi için normalize edilen erime eğrilerini yeni bir grafiğe yerleştirir. Bu yazılım aynı zamanda farklı genotip/dizilere sahip örnekleri gruplar halinde toplar ve böylelikle birçok veriyi içeren bir analizde sonuçları kolaylıkla yorumlamamızı sağlar. HRM analizinde satüre boyalar (LC GreenTM I, EVA Green ve Syto 9 gibi) kullanılır. Satüre olmayan boyalar (SYBR Green I gibi) veya interkalasyon boyları erime analizinde oldukça kullanışlı boylar olmalarına karşın, amplifikasyon reaksiyonları için oldukça toksiktirler ve bu sebeple de düşük konsantrasyonlarda

kullanılırlar. Aynı zamanda, denatürasyon başladığında çift iplikten ayrılan bu boyalar tekrar çift ipliğe bağlanabilme yeteneğine sahip olduklarından, erime analizlerinde büyük bir dezavantaja sahiptirler. Satüre olan boyaların ise toksik etkileri çok düşüktür ve bu sayede amplifikasyon sırasında *Taq* polimerazı inhibe etmezler. Yüksek konsantrasyonlarda kullanılarak tüm DNA'nın boya ile satürasyonu gerçekleştirilebilir. Böylelikle, yüksek konsantrasyonda kullanılan satüre boya, hedef DNA fragmanının uzunluğu boyunca DNA'ya bağlanır. Satüre olan boyalar da erime sırasında, dsDNA'nın denatüre olmaya başladığı bölgede DNA'dan ayrılmaya başlarlar. Serbest kalan boya, DNA'nın denatüre olmayan bölgelerinde satüre boyanın varlığı nedeniyle, tekrar DNA'ya bağlanamaz. Bu özellik daha detaylı ve doğru analiz yapılmasına olanak sağlar. HRM analizinde kullanılan boyaların sahip oldukları özellikler, HRM analizini konvansiyonel erime analizinden üstün kılar (Wojdacz vd 2009). Yukarıdaki açıklamalar doğrultusunda çalışmamızda *GADD45γ* metilasyon durumunu belirlemek için diğer yöntemlere göre oldukça avantajlı olan HRM analizini kullandık ve tüm olgulardan informatif sonuçlar aldık. Ayrıca, HRM analizinde tek bir primer seti ile DNA metilasyon analizinin yapılabilmesi, araştırmalarda bu yöntemin konvansiyonel metilasyona-özgün PCR'dan daha az maliyetli kılmaktadır. DNA metilasyon profillerinin belirlenmesinde, HRM analizinin duyarlılık, özgünlük ve maliyet açısından diğer metilasyona-özgün PCR yöntemlerine göre daha üstün olduğunu düşünmekteyiz.

DBBHL oluşumu ve progresyonunda rol oynayan mekanizmalardan biri de apoptotik yolların regülasyonunda yer alan Bcl-2 ve Bcl-x_L gibi anti-apoptotik kritik moleküllerin ekspresyonlarındaki değişimlerdir (Catz SD ve Johnson JL 2003). Neto ve arkadaşları (2010) DBBHL'li 27 olguda Bcl-2 ekspresyon profilini incelemişler ve yüksek riskli olguların %37'sinde Bcl-2 ekspresyonunu pozitif olarak değerlendirmişlerdir. ABC-benzeri ve GCB-benzeri DBBHL alt sınıfları arasında, bu protein ekspresyonu açısından anlamlı bir fark bulamamışlardır. Sohn SK ve arkadaşları (2003) DBBHL'li 94 olgunun 24 (%26)'ünde Bcl-2 ekspresyonunu pozitif olarak değerlendirmişlerdir. Bcl-2-pozitif ve Bcl-2-negatif olgu grupları için 3-yıllık sağkalım oranlarını sırasıyla %36.3 ve %69.3 olarak belirledikleri bu çalışmalarında, Bcl-2 ekspresyonu ile kısa sağkalım oranı arasında anlamlı bir ilişki bulmuşlardır. Llanos M ve arkadaşları (2001) DBBHL'li 55 olgunun 34 (%61)'ünde Bcl-2 ekspresyonu pozitif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada hem ileri evre (Evre 3-4) hem de birden fazla extranodal tutulum görülen DBBHL olgular ile bcl-2 ekspresyonu arasında anlamlı bir

ilişkinin olduğunu belirlemişlerdir. Barans SL ve arkadaşları (2001) DBBHL tanısı alan 169 adet olgunun 88 (%52)'inde Bcl-2 ekspresyonunu pozitif olarak değerlendirmişlerdir. Eow ve arkadaşları (2006) 67 DBBHL tanısı alan arşiv doku örneklerinin 43 (%64)'ünde pozitif Bcl-2 ekspresyonu görmüşlerdir. DBBHL'li 67 örneğin 24'ü nodal yerleşimli ve 43'ü extranodal yerleşimli olarak değerlendirilmiştir ve Bcl-2 ekspresyonu nodal yerleşimli DBBHL olgularında, extranodal yerleşimli olgulara göre daha yüksek bulunmuştur. Aynı çalışmada, nodal tutulum gösteren olguların %72'si ve ekstranodal tutulum gösteren olguların %50'si Bcl-2 ekspresyonu açısından pozitif olarak değerlendirilmiştirlerdir. Ertan Y ve arkadaşları (2005) Bcl-2 ekspresyonunu DBBHL tanısı alan 55 olgunun 35 (%66)'inde pozitif olarak değerlendirmişlerdir. DBBHL'de Bcl-2 ekspresyonu ile sağkalım ve mitotik aktivite arasında anlamlı bir ilişki bulamamışlardır. Sanchez (1998), Hermine (1996) ve Gascoyn ve arkadaşları (1997) DBBHL'de Bcl-2 protein ekspresyonu ve sağkalım arasında ilişki bulmuşlardır. Aynı zamanda Bcl-2 protein ekspresyonunun zayıf bir prognostik faktör olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bai ve arkadaşları (2004) 77 DBBHL'li olgunun 46(%60)'sını Bcl-xl ekspresyonu açısından pozitif olarak değerlendirmişler ve GCB-benzeri DBBHL'de anti-apoptotik Bcl-xl ekspresyonunu, ABC-benzeri DBBHL'ya göre daha düşük bulmuşlardır. Apoptotik indeksi ise GCB-benzeri DBBHL'de ABC-benzeri DBBHL'ye göre daha yüksek bulmuşlardır. Çalışmamızda DBBHL tanısı alan 40 örneğin 3'ünde (%7.5) Bcl-2 ve 33'ünde (%82.5) Bcl-XL aşırı ekspresyonu belirlendi. *BCL2* geninin anti-apoptotik bir faktör olarak fonksiyon yaptığı ve DBBHL'de sıklıkla deregüle olduğu bilinmektedir. Bu nedenle birçok çalışmada hem patogenezin aydınlatılmasında hem de prognostik bir belirteç olarak değerlendirilmesine rağmen, yukarıda da tartışıldığı üzere elde edilen sonuçlar birbirleriyle uyum göstermemektedir. Bu uyumsuz veriler, bir anlamda DBBHL'nin oldukça heterojen yapısını destekler niteliktedir.

GADD45α ve β 'nin, hücrelerde apoptozu ancak belli koşullarda uyarabilmelerine karşın, *GADD45γ*'nin G₂/M, G₁/S evrelerinde hücre döngüsünü durdurulmasında ve apoptozun uyarımında daha kritik rol oynadığı ileri sürülmüştür (Thyss vd 2005, Liebermann ve Hoffman 2007, Tamura vd 2012). Bu nedenle, çalışmamızda *GADD45γ* ekspresyonunun apoptozla olan ilişkisini değerlendirdik. Chung ve arkadaşları (2003), normal tiroid hücreleri ile karşılaştırıldığında, anaplastik tiroid kanser hücre hatlarında *GADD45γ* ekspresyonunun önemli derecede azaldığını belirlemişlerdir. Endojen

GADD45 γ eksprese eden bu hücrelerinde apoptoz düşük derecede gözlenirken, GADD45 γ 'nın reeksprese edildiği kanser hücrelerinde apoptozda artış gözlenmiştir. Bu çalışmada, GADD45 γ 'nın anaplastik tiroid kanser hücrelerinde çoğalmayı-inhibe edici etkisinin apoptoza neden olabileceği öne sürülmüştür. Saha ve arkadaşları (2010), akciğer kanser hücre hattı (PC9) ile yaptıkları çalışmalarında, fenolik bir bileşik olan kurkuminin p53-bağımsız yolla GADD45 γ ekspresyonunu arttırdığını ve bu artışın apoptoza neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Kurkuminin anti-kanser aktivitesindeki mekanizmanın GADD45 γ ekspresyon artışı ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür. GADD45 proteinlerinin hem mitokondri üzerinden hem de p38/JNK yolağı üzerinden hücreyi ölüme götürdükleri düşünülmektedir. NF- κ B, bir transkripsiyon faktörü olan c-myc ekspresyonunu artırır ve bu da GADD45 α ve GADD45 γ ekspresyonlarını inhibe ederken GADD45 β ekspresyonunu değiştirmez. Bu mekanizma üzerinden JNK-aracılı apoptozun, GADD45 α ve GADD45 γ 'nın sessizleştirilmesi ile bloke edilebileceği öne sürülmektedir. GADD45 α elongasyon faktörü 1- α ile etkileşime girerek mitokondri-aracılı hücre ölümünü aktive eder. Bu etkileşim hücre iskeleti stabilitesini bozar ve Bim'in membran yapısını oluşturan mikrotübüllerden ayrılmasına bağlı olarak mitokondri üzerinden apoptoza neden olur. GADD45 α ve GADD45 γ 'nın pro-apoptotik fonksiyonlarına zıt olarak, GADD45 β , mitojenle-aktive protein kinaz kinaz 7 (MKK7)'yi inhibe ederek, TNF- α aracılığı ile JNK üzerinden gerçekleşen apoptozu inhibe eder (Tamura vd 2012). GADD45 γ , PCNA ile etkileşime girerek NER aracılı DNA tamir mekanizmasını aktive ederken, GADD45 α ve GADD45 β , GADD45 γ üzerinden NER aracılı DNA tamir mekanizmasını aktive eder. Ayrıca GADD45 γ ve α aracılı bir transkripsiyonel koaktivatör olan CRIF1 overekspresyonu ile hücre döngüsü G1/S ve G2/M evrelerinde durdurulabilir. GADD45 γ 'nın apoptoz yollarındaki etki mekanizması ile ilgili bilgilerimiz oldukça sınırlıdır ve GADD45 γ ile uyarılan apoptozun derecesi ile birlikte hücre tipine göre gösterdiği değişiklik henüz net olarak bilinmemektedir. Çalışmamız, DBBHL'de GADD45 γ ekspresyonu ve apoptoz ilişkisini araştıran ilk çalışmadır. DBBHL olgularında GADD45 γ ekspresyonunda anlamlı artış gözlenmesine rağmen, GADD45 γ ekspresyon durumu ile apoptozla ilişkili proteinler ve AI arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı. Bu sonuçlar bize DBBHL'de apoptoz regülasyonunun çok daha karmaşık bir mekanizma ile sağlandığını ve GADD45 γ 'nın,

tek başına kanser hücrelerinde bu programlı hücre ölüm tipine neden olmadığını göstermektedir.

Herhangi bir katalitik aktiviteleri olmamasına rağmen GADD45 proteinlerinin DNA demetilasyonunda önemli rol oynadıklarını ve DNA demetilasyonunu NER ve BER mekanizmalarına dahil olarak gerçekleştirdiklerine dair veriler artmaktadır. Bu süreçte GADD45 proteinlerinin, nükleotid ve/veya baz eksizyon tamir faktörlerini gen-spesifik hedef bölgelere çağırdığı ve tamir faktörleri ile kromatin arasında bir adaptör protein gibi rol oynadığı öne sürülmektedir. Dolayısıyla, GADD45 proteinlerinin epigenetik ve DNA tamiri arasında bağlantıyı sağladıkları düşünülmektedir (Niehrs ve Schäfer 2012). Ancak, GADD45-aracılı DNA demetilasyonunun karsinogenez üzerinde nasıl bir etkiye sahip olduğu henüz bilinmemektedir. Yukarıda tartışılan tüm veriler eşliğinde, GADD45 γ 'nın DBBHL'nin oluşumundan veya progresyonundan sorumlu olabilecek genlerin demetilasyonuna neden olarak (bir başka ifade ile sorumlu genlerin ekspresyonlarının epigenetik kontrolünü sağlayarak) veya DNA tamir mekanizmasını etkileyerek karsinogenez sürecinde yer alabileceği ile ilgili yeni çalışmaların yapılması gerektiğini düşünmekteyiz. Bu çerçevede bir başka önemli soru da GADD45-aracılı DNA demetilasyonunun hücrel metilasyon paterninin belirlenmesinde ne kadar önemli olduğudur.

Sonuç olarak, bu çalışmadan elde edilen veriler, literatürle uyumlu olarak solid tümörlerin aksine DBBHL örneği üzerinden hematolojik malignansilerde *GADD45* γ metilasyon sıklığının daha yüksek olduğunu ve *GADD45* γ hipermetilasyonunun tümör-spesifikliği gösterdiğini teyit etmektedir. Aynı zamanda, ileri evre olgularda *GADD45* γ metilasyon sıklığının erken evre olgulara oranla çok daha yüksek olması, *GADD45* γ geninde gözlenen bu epigenetik değişimin DBBHL progresyonunda önemli rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

6. SONUÇLAR

DBBHL, agresif lenfomaların en büyük grubunu ve NHL'ların yaklaşık %30-40'ını oluşturmaktadır. DBBHL klinik bulgu, morfoloji, genetik ve moleküler özelliklerindeki farklılıklar nedeniyle tek bir klinikopatolojik antite yerine heterojen bir tümör grubu olarak değerlendirilmektedir.

DBBHL'nin patogeneğinde, hücre döngüsü ve apoptotik yollarda düzensizliğe neden olan farklı mekanizmalar rol oynamaktadır. “*Growth Arrest DNA Damage-Inducible 45*” (*GADD45*) gen ailesi DNA tamiri, hücre döngüsü kontrolü, hücre gelişimi ve sağkalımı, genotoksik stres gibi hücresel fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir gen ailesidir ve *GADD45α*, *GADD45β*, *GADD45γ* olmak üzere 3 üyeden oluşmaktadır.

GADD45γ, hücre döngüsünün negatif regülasyonunda rol oynayan bir genidir. Hem hematolojik malignansiler hem de solid tümörlerde *GADD45γ* metilasyon sıklığı ve protein ekspresyon düzeyleri ile ilgili birçok çalışma bulunmasına rağmen, DBBHL'de sözkonusu genin metilasyon durumu ve ekspresyon düzeyi hakkında detaylı bilgi bulunmamaktadır. Bu amaçla planlanan çalışmamızın ana sonuçları aşağıda belirtilen maddeler halinde özetlenebilir:

- Literatürle uyumlu olarak, solid tümörlerin aksine DBBHL'de *GADD45γ* metilasyon sıklığı yüksektir (%55). Bu çalışma, literatürde hem geniş seri DBBHL olgularında tamamlanan hem de malign (DBBHL) ve malign olmayan doku (RLD) örneklerindeki verileri karşılaştıran ilk çalışmadır.
- Klinik evrelerine göre değerlendirildiğinde, ileri evre olgularda *GADD45γ* metilasyon sıklığının erken evre olgulara oranla 17 kat daha yüksek olduğu belirlendi ($P=0.041$). Bu bulgu, sözkonusu gende gözlenen bu epigenetik değişimin

DBBHL'nin progresyonunda rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

- Çalışmada değerlendirilen kontrol DNA örneklerinden ve tüm olgulardan informatif sonuçların alınması nedeniyle, Metilasyona-öзgün HRM Analizi *GADD45γ* metilasyon profilini belirlemede duyarlılık, özgünlük ve maliyet açısından kullanılabilir bir yöntemdir.
 - *GADD45γ* protein ekspresyon oranları DBBHL'li ve RLD'li olgularda sırası ile %45 ve %5 olarak belirlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *GADD45γ* protein ekspresyonundaki artışın anlamlı olması, DBBHL patogeneğinde *GADD45γ*'nin yer alabileceğini düşündürmektedir.
 - *GADD45γ* metilasyonu ve protein ekspresyonu arasında korelasyonun bulunmaması, bu alanda yeni çalışmaların yapılması gerekliliğini göstermektedir. Bu yeni çalışmalar 4 ana başlık altında özetlenebilir:
 - a) Daha ileri yöntemler (bisülfid dizi analizi gibi) kullanılarak *GADD45γ* geninde, çalışmamızda değerlendirilen promoter bölgesinde metilasyon düzeyinin belirlenmesi,
 - b) *GADD45γ* geninde, çalışmamızda değerlendirilen promoter bölgesi dışındaki diğer CpG alanlarının metilasyon durumunun belirlenmesi,
 - c) DNA metilasyonu dışında diğer epigenetik mekanizmalardaki değişimlerin belirlenmesi,
 - d) *GADD45γ* ekspresyon düzeyinin belirlenmesinde kullanılacak IHK yönteminin standardize edilmesidir.
- DBBHL içindeki heterojeniteyi yansıtacak şekilde, DBBHL olgularında Bcl-2 ekspresyon sıklığı (%7.5) literatürde belirtilen ekspresyon sıklığından daha düşük bulundu. Literatürle uyumlu olarak, Bcl-x_L ekspresyon sıklığı (%82.5) yüksek bulundu.
- Kontrol grubu ve DBBHL olgu gruplarında AI sırası ile 0.5 ve 0.6 olarak belirlendi ve bu iki grup arasında AI açısından anlamlı bir fark bulunmadı. Bu çalışmada sadece 2 anti-apoptotik proteinin ekspresyonu değerlendirildi. Ancak, diğer tüm malignensilerde olduğu gibi DBBHL'de de Bcl-2 ailesi proteinlerinin (pro-

apoptotik: bax, bak, bok, bad, bik, bim, bid ve anti-apoptotik: bcl2, bcl-xl ve mcl1) ekspresyonlarındaki farklılıkların, apoptotik durumdaki varyasyonların sadece bir bölümünü açıklayabileceğini düşünmekteyiz.

- Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, DBBHL olgularında GADD45 γ ekspresyonunda anlamlı artış gözlenmesine rağmen, GADD45 γ ekspresyon durumu ile apoptozla ilişkili proteinler ve AI arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı. Bu sonuçlar bize DBBHL’de apoptoz regülasyonunun çok daha karmaşık bir mekanizma ile sağlandığını ve GADD45 γ ’nın, tek başına kanser hücrelerinde bu programlı hücre ölüm tipine neden olmadığını göstermektedir.

7. KAYNAKLAR

- Abdollahi, A., Lord, K.A., Hoffman-Liebermann, B., Liebermann, D.A. (1991) Interferon regulatory factor 1 is a myeloid differentiation primary response gene induced by interleukin 6 and leukemia inhibitory factor: role in growth inhibition. *Cell Growth Differ.*, 2(8):401-7.
- Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., Ma C., Lossos, I.S., Rosenwald, A., Boldrick, J.C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, J.I., Yang, L., Marti, G.E., Moore, T., Hudson, J.Jr., Lu, L., Lewis, D.B., Tibshirani, R., Sherlock, G., Chan, W.C., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Armitage, J.O., Warnke, R., Levy, R., Wilson, W., Grever, M.R., Byrd, J.C., Botstein D., Brown P.O., Staudt L.M. (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature.*, 403:503-11.
- Amen, F., Horncastle, D., Elderfield, K., Banham, A.H., Bower, M., Macdonald, D., Kanfer, E., Naresh, K.N. (2007) Absence of cyclin-D2 and Bcl-2 expression within the germinal centre type of diffuse large B-cell lymphoma identifies a very good prognostic subgroup of patients. *Histopathology*, 51:70-9.
- Anderson, L.A., Gadalla, S., Morton, L.M., Landgren, O., Pfeiffer, R., Warren, J.L., Berndt S.I., Ricker W., Parsons R., Engels E.A. (2009) Population-based study of autoimmune conditions and the risk of specific lymphoid malignancies. *Int J Cancer.*, 125:398-405.
- Azam, N., Vairapandi, M., Zhang, W., Hoffman, B., Liebermann, D.A. (2001) Interaction of CR6 (GADD45 γ) with proliferating cell nuclear antigen impedes negative growth control. *J Biol Chem.*, 276(4):2766-74.
- Bahar, A., Bicknell, J.E., Simpson, D.J., Clayton, R.N., Farrell, W.E. (2004), Loss of expression of the growth inhibitory gene GADD45 γ , in human pituitary adenomas, is associated with CpG island methylation. *Oncogene*, 23:93-44.
- Bai, M., Skyrilas, A., Agnantis, N.J., Kamina, S., Tsano, E., Grepì, C., Galani, V., Kanavaros P., et al. (2004) Diffuse large B-cell lymphomas with germinal center B-cell like differentiation immunophenotypic profile are associated with high apoptotic index, high expression of the proapoptotic proteins bax, bak and bid and low expression of the antiapoptotic protein bcl-xl. *Modern Pathol.*, 17: 847-56.
- Barsyte-Lovejoy, D., Mao, D.Y., Penn, L.Z. (2004) c-Myc represses the proximal promoters of GADD45a and GADD153 by a post-RNA polymerase II recruitment mechanism. *Oncogene*. 22;23(19):3481-6.
- Basso, K., Klein, U., Niu, H., Stolovitzky, G.A., Tu Y., Califano A., Cattoretti G., Dalla-Favera R. (2004) Tracking CD40 signaling during germinal center development. *Blood.*, 15;104(13):4088-96.

- Beadling, C., Johnson, K.W, Smith, K.A. (1993) Isolation of interleukin 2-induced immediate-early genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1;90(7):2719-23.
- Burry, R.W. (2010), Immunocytochemistry: A Practical Guide for Biomedical Research. In Chapter 2: Antibodies, New York, *Springer*, p. 7-16
- Cabanillas, F. (2010) Front-line management of diffuse large B cell lymphoma. *Curr Opin Oncol.*, 22:642–5.
- Camcıoğlu, Y., Deniz, G., (2007) Temel İmmunoloji: İmmun Sistemin İşlev ve Bozuklukları. Abbas AK, Litchman AH Basic Immunology Çeviri kitabı,
- Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R.S., Zhang, Y. (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science.*, 1;298(5595):1039-43.
- Carrier, F., Smith, M.L., Bae, I., Kilpatrick, K.E., Lansing, T.J., Chen, C.Y., Engelstein, M., Friend, S.H., Henner, W.D., Gilmer, T.M., Kastani, M.B., Fornaca, A.J. (1994) Characterization of human Gadd45, a p53-regulated protein. *J Biol Chem.*, 23;269(51):32672-7.
- Cattoretti, G., Pasqualucci, L., Ballon, G., Tam, W., Nandula, S.V., Shen Q., Mo T., Murty V.V., Dalla-Favera R. (2005) Deregulated BCL6 expression recapitulates the pathogenesis of human diffuse large B cell lymphomas in mice. *Cancer Cel.*, 7(5):445-55.
- Catz, S.D., Johnson, J.L. (2003) BCL-2 in prostate cancer: a minireview. *Apoptosis.* 8(1):29-37.
- Choi, W.W., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Piris, M.A., Banham, A.H., Delabie, J., Braziel, R.M., Geng, H., Iqbal, J., Lenz, G., Vose, J.M., Hans, C.P., Fu, K., Smith, L.M., Li, M., Liu, Z., Gascoyne, R.D., Rosenwald, A., Ott, G., Rimsza, L.M., Campo, E., Jaffe, E.S., Jaye, D.L., Staudt, L.M., Chan, W.C. (2009) A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res.*, 15:5494-502.
- Chung, H.K., Yi, Y.W., Jung, N.C., Kim, D., Suh, J.M., Kim, H., Park, K.C., Kim, D.W., Hwang, E.S., Song, J.H., Ku, B.J., Han, H.J., Ro, H.K., Kim, J.M., Shong, M. (2003), Gadd45 expression is reduced in anaplastic thyroid cancer and its reexpression results in apoptosis, *J Clin Endocrinol Metab.*, 88(8):3913-20.
- Compagno, M., Lim, W.K., Grunn, A., Nandula, S.V., Brahmachary, M., Shen, Q., Bertoni, F., Ponzoni, M., Scandurra, M., Califano, A., Bhagat, G., Chadburn, A., Dalla-Favera, R., Pasqualucci, L. (2009) Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature.*, 4;459(7247):717-21.
- Cretu, A., Sha, X., Tront, J., Hoffman, B., Liebermann, D.A.(2009) Stress sensor Gadd45 genes as therapeutic targets in cancer. *Cancer Ther.*, 7(A):268-276.
- Dahl, C., Gronbaek, K., Guldborg, P., (2011) Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited. *Clinica Chimica Acta.*, 412: 831-36.
- Davis, R.E., Brown, K.D., Siebenlist, U., Staudt, L.M. (2001) 'Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells.' *J Exp Med.*, 17;194(12):1861-74.

- De Roos, A.J., Davis, S., Colt, J.S., Blair, A., Airola, M., Severson, R.K., Cozen, W., Cerhan, J.R., Hartge, P., Nuckols, J.R., Ward, M.H. (2010) Residential proximity to industrial facilities and risk of non-Hodgkin lymphoma.' *Environ Res.*, 110:70-78.
- De, S., Shaknovich, R., Riester, M., Elemento, O., Geng, H., Kormaksson, M., Jiang, Y., Woolcock, B., Johnson, N., Polo, J.M., Cerchietti, L., Gascoyne, R.D., Melnick, A., Michor, F. (2013) Aberration in DNA methylation in B-cell lymphomas has a complex origin and increases with disease severity. *PLoS Genet.* 9(1):e1003137.
- De Leval, L., Bonnet, C., Copie-Bergman, C., Seidel, L., Baia, M., Brière, J., Molina, T.J., Fabiani, B., Petrella, T., Bosq, J., Gisselbrecht, C., Siebert, R., Tilly, H., Haioun, C., Fillet, G., Gaulard, P. (2012) Diffuse large B-cell lymphoma of Waldeyer's ring has distinct clinicopathologic features: a GELA study. *Ann Oncol.* 23(12):3143-51.
- Diaz, M., Daly, J. (2009) Immunology: B cells break the rules. *Nature*, 9;460(7252):184-6.
- Eow, G.I., Kim, L.H., Peh, S.C. (2006) The Pattern of CD15, CD30 and Bcl-2 Expression in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Med J Malaysia.*, 61 (4): 416-421.
- Ertan, Y., Soydan, S., Tombuloglu, M., Cagirgan, S., Donmez, A., Saydam, G., Hekimgil, M. (2006) Mitotic activity, p53 and bcl-2 protein immunoreactivity difference between morphological variants and subtypes of diffuse large b cell lymphoma. *Ege Tip Dergisi*, 45 (1): 5 -11.
- Espada, J., Esteller, M. (2010) DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment. *Semin Cell Dev Biol.*, 21(2):238-46.
- Essers, J., Theil, A.F., Baldeyron, C., van Cappellen, W.A., Houtsmuller, A.B., Kanaar, R., Vermeulen, W., (2005) Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair, *Mol Cell Biol.*, 25(21):9350-9.
- Fan, W., Richter, G., Cereseto, A., Beadling, C., Smith, K.A. (1999) Cytokine response gene 6 induces p21 and regulates both cell growth and arrest. *Oncogene.*, 18:6573–82.
- Fisher, S.G., Fisher, R.I., (2004) The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene.*, 23; 23(38):6524-34).
- Flowers, C.R., Sinha, R., Vose, J.M. (2010) Improving outcomes for patients with diffuse large B-cell lymphoma. *CA Cancer J Clin.*, 60(6):393-408.
- Fornace, AJ. Jr, Alamo, I. Jr, Hollander, M.C. (1988) DNA damage-inducible transcripts in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(23):8800-4.
- Fornace, AJ Jr., Nebert, DW., Hollander, MC., Luethy, JD., Papatheanasiou, M., Fargnoli, J., Holbrook, NJ. MC, (1989) Mammalian genes coordinately regulated by growth arrest signals and DNA-damaging agents. *Mol Cell Biol.*, 9(10):4196-203.
- Friedberg, JW. (2011) Relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.*, 2011:498-505.
- Garrity, M.M., Burgart, L.J., Riehle, D.L., Hill, E.M., Sebo, T.J., Witzig, T. (2003), Identifying and quantifying apoptosis: navigating technical pitfalls, *Mod Pathol.* 16(4):389-94.
- Gascoyne, R.D., Lamant, L., Martin-Subero, J.I., Lestou, V.S., Harris, N.L., Müller-Hermelink, H.K., Seymour, J.F., Campbell, L.J., Horsman, D.E., Auvigne, I., Espinos, E., Siebert, R., Delsol, G. (2003) ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma is

- associated with Clathrin-ALK rearrangements: report of 6 cases. *Blood.*, 1;102(7):2568-73.
- Gleissner, B., Zwick, C., Pfreundschuh, M. (2008) Treatment of diffuse large B-cell lymphoma. *Dtsch Med Wochenschr.* 133(36):1785-94; quiz 1795-6.
- Greer, J.P. (2009) Non-Hodgkin Lymphoma in Adults, 12th ed., In: Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, et al, *Wintrobe's Clinical Hematology*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; s: 2144-2194
- Gupta, M., Gupta, S.K, Hoffman, B., Liebermann, D.A. (2006) Gadd45a and Gadd45b protect hematopoietic cells from UV-induced apoptosis via distinct signaling pathways, including p38 activation and JNK inhibition. *J Biol Chem.* 30;281(26):17552-8.
- Hallack Neto, A.E., Siqueira, S.A., Dulley, F.L., Chauobah, A, Belesso, M., Saboia, R, Ruiz, M.A., Chamone, D.A., Pereira, J. (2010) Bcl-2 protein frequency in patients with high-risk diffuse large B-cell lymphoma. *Sao Paulo Med J.*, 128(1):14-7.
- Hans, C.P., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Gascoyne, R.D., Delabie, J., Ott, G., Muller-Hermelink, H.K., Campo, E., Braziel, R.M., Jaffe, E.S., Pan, Z., Farinha, P., Smith, L.M., Falini, B., Banham, A.H., Rosenwald, A., Staudt, L.M., Connors, J.M., Armitage, J.O., Chan, WC. (2004) Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray.' *Blood*, 103:275-82.
- Hayslip, J. and Montero, A., 2006 Tumor suppressor gene methylation in follicular lymphoma: a comprehensive review. *Mol Cancer.*, 6;5:44.
- Hendrik, N., Bernd, D., and Georg, L. (2011) Pathogenesis of Non-Hodgkin's Lymphoma *J Clin Oncol.*,10;29(14):1803-11.
- Hermine, O., Haioun, C., Lepage, E., d'Agay MF., Briere, J., Lavignac, C., Fillet, G., Salles, G., Marolleau, JP., Diebold, J., Reyas, F., Gaulard, P. (1996) Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood.* 1;87(1):265-72.
- Hiraga, J., Kinoshita, T., Ohno, T., Mori, N., Ohashi, H., Fukami, S., Noda, A., Ichikawa, A., Naoe, T. (2006) Promoter hypermethylation of the DNA-repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase and p53 mutation in diffuse large B-cell lymphoma. *Int J Hematol.*, 84(3):248-255.
- Hollander, M.C., Kovalsky, O., Salvador, JM., et al: (2001) Dimethylbenzanthracene carcinogenesis in Gadd45a-null mice is associated with decreased DNA repair and increased mutation frequency. *Cancer Res.*, 15;61(6):2487-91.
- Hollander, M.C., Sheikh, M.S., Bulavin, D.V., Lundgren, K., Augeri-Henmueller L., Shehee, R., Molinaro, T.A., Kim, K.E., Tolosa, E., Ashwell, J.D., Rosenberg, M.P., Zhan, Q., Fernández-Salguero, P.M., Morgan, W.F., Deng, C.X., Fornace, AJ. Jr. (1999) Genomic instability in Gadd45a-deficient mice. *Nat Genet. Oct.*, 23(2):176-84.
- Howard, C., Yehudit, B. (2011) Epigenetics of haematopoietic cell development. *Nature Reviews Immunology*, 10;11(7):478-88.

- Ito, S., D'Alessio, A.C., Taranova, O.V., Hong, K., Sowers, L.C., Zhang, Y. (2010) Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*, 26;466(7310):1129-33.
- Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K., Weiss, U. (1991) Intra-clonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature*, 354:389-392.
- Jin, S., Fan, F., Fan, W., Zhao, H., Tong, T., Blanck, P., Alomo, I., Rajasekaran, B., Zhan, Q. (2001) Transcription factors Oct-1 and NF-YA regulate the p53-independent induction of the GADD45 following DNA damage. *Oncogene*, 10;20(21):2683-90.
- Kastan, M.B., Zhan, Q., el-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, BS, Vogelstein, B, Fornace, AJ Jr. (1992) A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*, 13;71(4):587-97.
- Kearsey, J.M., Coates, P.J., Prescott, A.R., Warbrick, E., Hall, P.A.(1995) Gadd45 is a nuclear cell cycle regulated protein which interacts with p21Cip1. *Oncogene*, 2;11(9):1675-83.
- Kenneth, M. Murphy, Paul ,Travers, Mark, Walport. (2008) Janeway's Immunobiology:, In chapter 7:The development and survival of lymphocytes, *Garland Science*, New York s: 257- 320
- Klein, U., Dalla-Favera, R. (2008) Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol.*, Jan;8(1):22-33.
- Kricker, A., Armstrong, B.K., Hughes, A.M., Goumas, C., Smedby, K.E., Zheng, T., Spinelli, J.J., De Sanjosé, S., Hartge, P., Melbye, M., Willett, E.V., Becker, N., Chiu, B.C., Cerhan, J.R., Maynadié, M., Staines, A., Cocco, P., Boffeta, P.; Interlymph Consortium. (2008) Personal sun exposure and risk of non Hodgkin lymphoma: a pooled analysis from the Interlymph Consortium. *Int J Cancer.*, 122:144-154.
- Küppers, R. & Dalla-Favera, R. (2001) 'Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene.*, 10;20(40):5580-94.
- Küppers, R. (2005) 'Mechanisms of B cell lymphoma pathogenesis.' *Nat Rev Cancer.*, 5(4):251-62.
- Küppers, R., Klein, U., Hansmann M. L. & Rajewsky K. (1999) Cellular origin of human B cell lymphomas. *N Engl J Med.*, 11;341(20):1520-9.
- LeBien, TW., Tedder ,TF. (2008) B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, 112(5):1570-80.
- Lenz, G., Nagel, I., Siebert, R., Roschke, A.V., Sanger, W., Wright, G.W., Dave, SS., Tan, B., Zhao, H., Rosenwald, A., Muller-Hermelink, HK., Gascoyne, RD., Campo, E., Jaffe, E.S., Smeland, EB., Fisher, RI., Kuehl, WM., Chan, WC., Staudt, LM. (2007) Aberrant immunoglobulin class switch recombination and switch translocations in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med.*, 19;204(3):633-43.

- Lenz, G., Wright, G., Dave, S.S., Xiao, W., Powell, J., Zhao, H., Xu, W., Tan, B., Goldschmidt, N., Iqbal, J., Vose, J., Bast, M., Fu, K., Weisenburger, DD., Greiner, TC., Armitage, JO., Kyle, A., May, L., Gascoyne, RD., Connors, JM., Troen, G., Holte, H., Kvaloy, S., Dierickx, D., Verhoef, G., Delabie, J., Smeland, EB., Jares, P., Martinez, A., Lopez-Guillermo, A., Montserrat, E., Campo, E., Braziel, RM., Miller, TP., Rimsza, LM., Cook, JR., Pohlman, B., Sweetenham, J., Tubbs, RR., Fisher, RI., Hartmann E., Rosenwald, A., Ott G., Muller-Hermelink, HK., Wrench, D., Lister, TA., Jaffe, ES., Wilson, WH., Chan, WC., Staudt, LM.; (2008) Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med.* 27;359(22):2313-23.
- Liebermann, DA., Hoffman, B. (1998) MyD genes in negative growth control. *Oncogene.*, 24;17(25):3319-29.
- Liebermann, DA., Hoffman, B. (2007) Gadd45 in the response of hematopoietic cells to genotoxic stress. *Blood Cells Mol Dis.*, 39(3):329-35.
- Llanos, M., Alvarez-Argüelles, H., Alemán, R., Oramas, J., Diaz-Flores, L., Batista, N. (2001), Prognostic significance of Ki-67 nuclear proliferative antigen, bcl-2 protein, and p53 expression in follicular and diffuse large B-cell lymphoma, *Med Oncol.*, 18(1):15-22.
- Martini, FH., Nath, JL., Bartholomew, EF. (2012). *Fundamentals of Anatomy & Physiology* (9th Edition), Chapter 19: Blood, Benjamin Cummings,
- Martín-Subero, J.I., Kreuz, M., Bibikova, M., Bentink, S., Ammerpohl, O., Wickham-Garcia, E., Rosolowski, M., Richter, J., Lopez-Serra, L., Ballestar, E., Berger, H., Agirre, X., Bernd, H.W., Calvanese, V., Cogliatti, S.B., Drexler, H.G., Fan, J.B., Fraga, M.F., Hansmann, ML., Hummel, M., Klapper, W, Korn, B, Küppers, R, Macleod, R.A., Möller, P., Ott, G., Pott, C., Prosper, F., Rosenwald, A., Schwaenen, C., Schübeler, D., Seifert, M., Stürzenhofecker, B., Weber, M., Wessendorf, S., Loeffler, M., Trümper, L., Stein, H., Spang, R., Esteller, M., Barker, D., Hasenclever, D., Siebert, R.; Molecular Mechanisms in Malignant Lymphomas Network Project of the Deutsche Krebshilfe. (2009) New insights into the biology and origin of mature aggressive B-cell lymphomas by combined epigenomic, genomic, and transcriptional profiling. *Blood.*, 113(11):2488-97
- Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R., Haaf, T. (2000) Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature.* 3;403(6769):501-2.
- Moore, L.D., Le, T., Fan, G. (2013) DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology.* 38(1):23-38.
- Morin, R.D., Johnson, N.A., Severson, T.M., Mungall, A.J., An, J., Goya, R., Paul, J.E., Boyle, M., Woolcock, B.W., Kuchenbauer, F., Yap, D., Humphries, R.K., Griffith, O.L., Shah, S., Zhu, H., Kimbara, M., Shashkin, P., Charlot, J.F., Tcherpakov, M., Corbett, R., Tam, A., Varhol, R., Smailus, D., Moksa, M., Zhao, Y., Delaney, A., Qian, H., Birol, I., Schein, J., Moore, R., Holt, R., Horsman, DE., Connors, JM., Jones, S., Aparicio, S., Hirst, M., Gascoyne, RD., Marr, MA. (2010) Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinalcenter origin. *Nat Genet.*, 42(2):181-5.
- Morton L.M., Purdue, M.P., Zheng, T., Wang, S.S., Armstrong, B., Zhang, Y., Menashe, I., Chatterjee, N., Davis, S., Lan, Q., Vajdic, CM., Severson, RK., Holford, TR., Krickler, A., Cerhan, JR., Leaderer, B., Grulich, A., Yeager, M., Cozen, W., Hoar,

- Zahm S., Chanock, S.J., Rothman, N., Hartge, P. (2009) Risk of non-Hodgkin lymphoma associated with germline variation in genes that regulate the cell cycle, apoptosis, and lymphocyte development. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 18:1259-1270.
- Moskalev, A., Plyusnina, E., Shaposhnikov, M., Shilova, L., Kazachenok, A., Zhavoronkov, A. (2012), The role of D-GADD45 in oxidative, thermal and genotoxic stress resistance, *Cell Cycle.*, 11(22):4222-41.
- Mughal, T.I., Goldman, J.M., Mughal, S.T. (2006) Understanding leukemias, lymphomas and myelomas. Chapter 4: Leukemias, *Taylor & Francis*, UK
- Muris, J.J., Meijer, C.J., Vos, W., van Krieken, J.H., Jiwa, N.M., Ossenkoppele G.J., Oudejans J.J. (2006) Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J Pathol.*, 208:714-23.
- Na, Y.K., Lee, S.M., Hong, H.S., Kim, J.B., Park, J.Y., Kim, D.S. (2010), Hypermethylation of growth arrest DNAdamage-inducible gene 45 in non-small cell lung cancer and its relationship with clinicopathologic features. *Mol Cells.*; 30:89–92.
- Nakayama, K., Hara, T., Hibi, M. Hirano, T.(1999) ‘A novel oncostatin M-inducible gene OIG37 forms a gene family with MyD118 and GADD45 and negatively regulates cell growth.’ *J Biol Chem.*, 27;274(35):24766-72.
- Ngo, V.N., Young, R.M., Schmitz, R., Jhavar, S., Xiao, W., Lim, K.H., Kohlhammer, H., Xu, W., Yang, Y., Zhao, H., Shaffer, A.L., Romesser, P., Wright, G., Powell, J., Rosenwald, A., Muller-Hermelink, H.K, Ott, G., Gascoyne, R.D., Connors, J.M., Rimsza, L.M., Campo, E., Jaffe, E.S., Delabie, J., Smeland, E.B., Fisher, R.I., Braziel, R.M., Tubbs, R.R., Cook, J.R., Weisenburger, D.D., Chan, W.C., Staudt, L.M. (2011) Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature.*, 3;470(7332):115-9.
- Niehrs, C., Schäfer, A. (2012) Active DNA demethylation by Gadd45 and DNA repair. *Trends Cell Biol.* 22(4):220-7.
- Okazaki, I.M, Hiai, H., Kakazu, N., Yamada, S., Muramatsu, M., Kinoshita, K., Honjo, T. (2003) Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis. *J Exp Med.* 5;197(9):1173-81.
- Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, A., Fundele, R., Dean, W. , Reik, W., Walter, J. (2000) Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote, *Curr Biol.*, 10(8):475-8.
- Paroush, Z., Keshet, I., Yisraeli, J., Cedar, H. (1990) Dynamics of demethylation and activation of the alpha-actin gene in myoblasts. *Cell.* Dec 21;63(6):1229-37.
- Pasqualucci, L., Compagno, M., Houldsworth, J., Monti, S., Grunn, A., Nandula, S.V., Aster, J.C., Murty, V.V., Shipp, M.A., Dalla-Favera, R. (2006) Inactivation of the PRDM1/ BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma.’ *J Exp Med.* 20;203(2):311-7.

- Pasqualucci, L., Dominguez-Sola, D., Chiarenza, A., Fabbri, G., Grunn, A., Trifonov, V., Kasper, L.H., Lerach, S., Tang, H., Ma, J., Rossi, D., Chadburn, A., Murty, V.V., Mullighan, C.G., Gaidano, G., Rabadan, R., Brindle, P.K., Dalla-Favera, R. (2011) Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. **Nature.**, 10;471(7337):189-95.
- Pasqualucci, L., Migliazza, A., Basso, K., Houldsworth, J., Chaganti, R.S., Dalla-Favera, R. (2003) Mutations of the BCL6 protooncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma. **Blood.**, 15;101(8):2914-23.
- Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R.S., Küppers, R., Dalla-Favera, R. (2001) Hypermutation of multiple protooncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. **Nature.**, 19;412(6844):341-6.
- Pileri, S.A., Zinzani, P.L., Gaidano, G., Falini, B., Gaulard, P., Zucca, E., Sabattini, E., Ascani, S., Rossi, M., Cavalli, F. (2003) International Extranodal Lymphoma Study Group. Pathobiology of primary mediastinal B-cell lymphoma. **Leuk Lymphoma.**, 44 Suppl 3:S21-6
- Rajewsky, K. (1996) Clonal selection and learning in the antibody system. **Nature**, 381(6585):751-8.
- Rawstron, A.C., Barrans, S.L., Blythe, D., English, A., Richards, S.J., Fenton, J.A., Davies, F.E., Child, J.A., Jack, A.S., Morgan, G.J. (2001) In multiple myeloma, only a single stage of neoplastic plasma cell differentiation can be identified by VLA-5 and CD45 expression. **Br J Haematol.** 113(3):794-802.
- Rimsza, L.M., Roberts, R.A., Miller, T.P., Unger, J.M., LeBlanc, M., Brazier, R.M., Weisenberger, D.D., Chan, W.C., Muller-Hermelink, H.K., Jaffe, E.S., Gascoyne, R.D., Campo, E., Fuchs, D.A., Spier, C.M., Fisher, R.I., Delabie, J., Rosenwald, A., Staudt, L.M., Grogan, T.M. (2004) Loss of MHC class II gene and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma is related to decreased tumor immunosurveillance and poor patient survival regardless of other prognostic factors: a follow-up study from the Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project. **Blood.** 1;103(11):4251-8.
- Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W.C., Connors, J.M., Campo, E., Fisher, R.I., Gascoyne, R.D., Muller-Hermelink, H.K., Smeland, E.B., Giltnane, J.M., Hurt, E.M., Zhao, H., Averett, L., Yang, L., Wilson, W.H., Jaffe, E.S., Simon, R., Klausner, R.D., Powell, J., Duffey, P.L., Longo, D.L., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Sanger, W.G., Dave, B.J., Lynch, J.C., Vose, J., Armitage, J.O., Montserrat, E., López-Guillermo A., Grogan T.M., Miller, T.P., LeBlanc, M., Ott, G., Kvaloy, S., Delabie, J., Holte, H., Krajci P., Stokke, T., Staudt, L.M.; Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. (2002) 'The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma' **N Engl J Med.**, 346(25):1937–1947.
- Rosenwald, A., Wright, G., Leroy, K., Yu, X., Gaulard, P., Gascoyne, R.D., Chan, W.C., Zhao, T., Haioun, C., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Lynch, J.C., Vose, J., Armitage, J.O., Smeland, E.B., Kvaloy, S., Holte, H., Delabie, J., Campo, E., Montserrat, E., Lopez-Guillermo, A., Ott, G., Muller-Hermelink, H.K., Connors, J.M., Brazier, R., Grogan, T.M., Fisher, R.I., Miller, T.P., LeBlanc, M., Chiorazzi, M., Zhao, H., Yang, L., Powell, J., Wilson, W.H., Jaffe, E.S., Simon, R., Klausner, R.D., Staudt, L.M. (2003) Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma

identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma.' *J Exp Med.*, 15;198(6):851-62.

- Rothman, N., Skibola, C.F., Wang, S.S., Morgan, G., Lan, Q., Smith, M.T., Spinelli, J.J., Willett, E., De Sanjose, S., Cocco, P., Berndt, S.I., Brennan, P., Brooks-Wilson, A., Wacholder, S., Becker, N., Hartge, P., Zheng, T., Roman, E., Holly, E.A., Boffetta, P., Armstrong, B., Cozen, W., Linet, M., Bosch, F.X., Ennas, M.G., Holford, T.R., Gallagher, R.P., Rollinson, S., Bracci, P.M., Cerhan, J.R., Whitby, D., Moore, P.S., Leaderer, B., Lai, A., Spink, C., Davis, S., Bosch, R., Scarpa, A., Zhang, Y., Severson, R.K., Yeager, M., Chanock, S., Nieters, A. (2006) Genetic variation in TNF and IL10 and risk of non-Hodgkin lymphoma: a report from the InterLymph Consortium. *Lancet Oncol.*, 7:27-38.
- Saha, A., Kuzuhara, T., Echigo, N., Fujii, A., Suganuma, M., Fujiki, H. Apoptosis of human lung cancer cells by curcumin mediated through up-regulation of "growth arrest and DNA damage inducible genes 45 and 153". (2010) *Biol Pharm Bull.*, 33(8):1291-9.
- Sánchez, R., Pantoja-Uceda, D., Torres, D., Prieto, J., Campos-Olivas, R., Blanco, FJ. (2008) NMR assignment and secondary structure of human growth arrest and DNA damage alpha protein (Gadd45 alpha). *Biomol NMR Assign.*, 2(2):139-42.
- Sanchez, E., Chacon, I., Plaza, M.M., Muñoz, E., Cruz, M.A., Martinez, B., Lopez, L., Martinez-Montero, J.C., Orradre, J.L., Saez, A.I., Garcia, J.F, Piris, M.A. (1998) Clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma is dependent on the relationship between different cell-cycle regulator proteins. *J Clin Oncol.* 16(5):1931-9.
- Savage, K.J., Monti, S, Kutok, J.L., Cattoretti, G., Neuberg, D., De Leval, L., Kurtin, P., Dal Cin, P., Ladd, C., Feuerhake, F., Aguiar, R.C., Li, S., Salles, G., Berger, F., Jing, W., Pinkus, G.S., Habermann, T., Dalla-Favera, R., Harris, N.L., Aster, J.C., Golub, T.R., Shipp, M.A. (2003) The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood.*, 1;102(12):3871-9.
- Schneider, C., Pasqualucci, L., Dalla-Favera, R. (2011) Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Diagn Pathol.*, 28(2):167-77.
- Schrag, J.D., Jiralerspong, S., Banville, M., Jaramillo M.L., O'Connor-McCourt, MD. (2008) The crystal structure and dimerization interface of GADD45gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 6;105(18):6566-71.
- Sen Turk, N., Ozsan, N., Caner, V., Karagenc, N., Duzcan, F., Duzcan, E., Hekimgil, M. (2011) Determination of apoptosis, proliferation status and O6-methylguanine DNA methyltransferase methylation profiles in different immunophenotypic profiles of diffuse large B-cell lymphoma *TJH.*, 28(1): 15-26.
- Shaffer, A.L., Rosenwald, A., Hurt, E.M., Giltane, J.M., Lam, L.T., Pickeral, O.K., Staudt, L.M. (2001) Signatures of the immune response. *Immunity.*, 15(3):375-85.
- Shaknovich, R., Geng, H., Johnson, N.A., Tsikitas, L, Cerchiotti, L., Grealley, J.M, Gascoyne, R.D., Elemento, O., Melnick, A. (2010) DNA methylation signatures define molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.*, 18;116(20):e81-9.
- Shaulian, E., Karin, M. (1999) Stress-induced JNK activation is independent of Gadd45 induction. *J Biol Chem.* 15;274(42):29595-8.

- Siegel, R., DeSantis, C., Virgo, K., Stein, K., Mariotto, A., Smith, T., Cooper, D, Gansler, T., Lerro, C., Fedewa, S., Lin, C., Leach, C., Cannady, R.S., Cho, H., Scoppa, S., Hachey, M., Kirch, R., Jemal, A., Ward, E. (2012) Cancer treatment and survivorship statistics, 2012 *CA Cancer J Clin.*, 62(4):220-41.
- Smith, M.L., Ford, J.M., Hollander, M.C., Bortnick, R.A., Amundson, S.A., Seo, Y.R., Deng, C.X, Hanawalt, P.C, Fornace, A.J. Jr. (2000) p53-mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes. *Mol Cell Biol.* 20(10):3705-14.
- Smith, M.L., Kontny, HU., Zhan, Q., Sreenath, A., O'Connor P.M., Fornace AJ Jr. (1996) Antisense GADD45 expression results in decreased DNA repair and sensitizes cells to u.v.-irradiation or cisplatin. *Oncogene.*, 21;13(10):2255-63.
- Smith, M.L., Chen, IT., Zhan, Q., Bae, I., Chen, CY., Gilmer, TM., Kastan, MB., O'Connor, PM., Fornace, AJ Jr. (1994) Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science.* 25;266(5189):1376-80.
- Sohn, SK., Jung, JT., Kim, DH., Kim, JG., Kwak, EK., Park, Ti., Shin DG., Sohn, KR., Lee, KB. (2003) Prognostic significance of bcl-2, bax, and p53 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Hematol.* 73(2):101-7.
- Steven, H., Swerdlow,, Elias, C., Nancy Lee, H. vd (2008): Who Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, *International Agency for Research on Cancer*, Lyon.
- Stevenson, F., Sahota, S., Zhu, D., Ottensmeier, C., Chapman, C., Oscier, D., Hamblin, T. (1998) Insight into the origin and clonal history of B cell tumors as revealed by analysis of immunoglobulin variable region genes. *Immunol Rev.*, 162:247-59.
- Stoimenov, I., Helleday, T. (2009) PCNA on the crossroad of cancer. *Biochem Soc Trans.*, 37(Pt 3):605-13
- Suzuki, M., Watanabe, TK., Fujiwara, T., Nakamura, Yp6, Takahashi, E, Tanigami, A. (1999) Molecular cloning, expression, and mapping of a novel human cDNA, GRP17, highly homologous to human gadd45 and murine MyD118. *J Hum Genet.*, 44(5):300-3.
- Sweetenham, JW. Diffuse large B-cell lymphoma: risk stratification and management of relapsed disease. (2005) *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* :252-9.
- Tahiliani, M., Koh, KP., Shen, Y., Pastor, WA., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer LM., Liu, DR., Aravind, L., Rao, A. (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science.* 15;324(5929):930-5.
- Takekawa, M., Saito, H. (1998) A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell.* 13;95(4):521-30.
- Tamura, RE., de Vasconcellos JF., Sarkar D., Libermann TA., Fisher PB., Zerbini LF. 2012 GADD45 proteins: central players in tumorigenesis. *Curr Mol Med.* 12(5):634-51.

- The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project (1997). A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood.*, 89:3909–3918.
- The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project (1997) Effect of age on the characteristics and clinical behavior of non-Hodgkin's lymphoma patients. *Ann Oncol.* Oct;8(10):973-8.
- Thieblemont, C., Briere, J., Mounier, N., Voelker, HU., Cuccuini, W., Hirsch, E., Rosenwald, A., Jack, A., Sundstrom, C., Cogliatti, S., Trougouboff, P., Boudova, L., Ysebaert, L., Soulier, J., Chevalier, C., Bron, D., Schmitz, N., Gaulard, P., Houlgatte, R., Gisselbrecht, C. (2011) The germinal center/activated B-cell subclassification has a prognostic impact for response to salvage therapy in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma: a bio-CORAL study. *J Clin Oncol.*,29(31):4079-87.
- Thyss, R., Virolle, V., Imbert, V., Peyron, JF., Aberdam, D., Virolle, T. (2005) NF-kappaB/Egr-1/Gadd45 are sequentially activated upon UVB irradiation to mediate epidermal cell death. *EMBO J.*12;24(1):128-37.
- Tilly, H., Vitolo, U., Walewski, J., da Silva, MG., Shpilberg, O, André, M, Pfreundschuh, M, Dreyling, M; ESMO Guidelines Working Group.(2012) Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 23 Suppl 7:vii78-82.
- Tront, JS., Hoffman, B., Liebermann, DA. (2006) Gadd45a suppresses Ras-driven mammary tumorigenesis by activation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 stress signaling resulting in apoptosis and senescence. *Cancer Res.* 1;66(17):8448-54.
- Türk Hematoloji Derneği (2012) Lenfoma: Tanı ve Tedavi Klavuzu, Türk Hematoloji Derneği Lenfoma Çalışma Grubu, Allame Tanıtım Matbaacılık, Ankara, s:49-51) .
- Vairapandi, M., Balliet, AG., Hoffman, B., Liebermann, DA.(2002) GADD45b and GADD45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress.' *J Cell Physiol.* 192(3):327-38.
- Valinluck, V., Tsai, HH., Rogstad, DK., Burdzy, A., Bird, A., Sowers LC. (2004) Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res.*, 9;32(14):4100-8.
- Velichutina, I., Shaknovich, R., Geng, H., Johnson, NA., Gascoyne, RD., Melnick AM., Elemento O.(2010)EZH2-mediated epigenetic silencing in germinalcenter B cells contributes to proliferation and lymphomagenesis. *Blood.*, 116(24):5247–5255.
- Vellenga, SJ. (2008) Longing for health. A practice of religious healing and biomedicine compared. *J Relig Health.*, 47(3):326-37.
- Weller, S., Braun, MC., Tan, BK., Rosenwald, A., Cordier, C., Conley, ME., Plebani, A., Kumararatne, DS., Bonnet, D., Tournilhac, O., Tchernia, G., Steiniger, B., Staudt, LM., Casanova, JL., Reynaud, CA., Weill, JC. (2004) Human blood IgM “memory” B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood.*1;104(12):3647-54.

- Wessendorf, S., Barth, TF., Viardot, A., Mueller, A., Kestler, HA., Kohlhammer, H., Lichter, P., Bentz, M., Döhner, H., Möller, P., Schwaenen, C. (2007) Further delineation of chromosomal consensus regions in primary mediastinal B-cell lymphomas: an analysis of 37 tumor samples using high-resolution genomic profiling (array-CGH). *Leukemia*, 21(12):2463-9.
- Wojdacz, T.K., Borgbo, T., Hansen, L.L. (2009) Primer design versus PCR bias in methylation independent PCR amplifications, *Epigenetics*, 4(4):231-4.
- Wright, G., Tan, B., Rosenwald, A., Hurt, EH., Wiestner, A., Staudt, LM. (2003) A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:9991-6.
- Ying, J., Srivastava, G., Hsieh, WS., Gao, Z., Murray, P., Liao, SK., Ambinder, R., Tao Q. (2005) The stress-responsive gene GADD45G is a functional tumor suppressor, with its response to environmental stresses frequently disrupted epigenetically in multiple tumors. *Clin Cancer Res.*, Sep 15;11(18):6442-9.
- Yoo, J., Ghiassi, M., Jirmanova, L., Balliet, AG., Hoffman, B., Fornace, AJ Jr., Liebermann, DA., Bottinger, EP., Roberts, AB. (2003) Transforming growth factor-beta-induced apoptosis is mediated by Smad-dependent expression of GADD45b through p38 activation. *J Biol Chem.*31;278(44):43001-7.
- Zerbini, LF., Czibere, A., Wang, Y., Correa, RG., (2006) A novel pathway involving melanoma differentiation associated gene-7/interleukin-24 mediates nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis and growth arrest of cancer cells. *Cancer Res.* 15;66(24):11922-31.
- Zerbini, LF., Libermann, TA. (2005) GADD45 deregulation in cancer: frequently methylated tumor suppressors and potential therapeutic targets. *Clin Cancer Res.* 15;11(18):6409-13.
- Zerbini, LF., Wang, Y., Czibere, A., Correa, RG., Cho, JY., Ijiri, K., Wei, W., Joseph, M., Gu, X., Grall, F., Goldring, MB., Zhou, JR., Libermann, TA. (2004) NF-kappa B-mediated repression of growth arrest- and DNA-damage-inducible proteins 45alpha and gamma is essential for cancer cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14;101(37):13618-23.
- Zhan, Q., Antinore, MJ., Wang, XW., Carrier, F., Smith, ML., Harris, CC., Fornace, AJ Jr. (1999) Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene.*, 6;18(18):2892-900.
- Zhang, W., Li, T., Shao, Y., Zhang, C., Wu, Q., Yang, H., Zhang, J., Guan, M., Yu, B., Wan, J. (2010) Semi-quantitative detection of GADD45-gamma methylation levels in gastric, colorectal and pancreatic cancers using methylation-sensitive high-resolution melting analysis. *J Cancer Res Clin Oncol.*, 136(8):1267-73.
- Zhang, W., Bae, I, Krishnaraju, K., Azam, N., (1999) CR6:A third member in the MyD118 and Gadd45 gene family which functions in negative growth control' *Oncogene.*, 2;18(35):4899-907.

- WEB_1. (2011) Türkiye Bilimler Akademisi web sitesi. <http://www.tuba.gov.tr/tr/kok-hucre-yayinlar/1511-kok-hucre-biyolojisi-ve-klinik-uygulamalar.html> (Haziran 2013).
- WEB_2. (2013) World Health Organization's web site. <http://www.who.int/cancer/en/index.html> (Haziran 2013).
- WEB_3. (2010) T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı <http://www.sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/.../saglikistatistikleriyilligi2010.pdf> (Haziran 2013).
- WEB_4. (2012) Lymphoma Research Foundation's web site. <http://www.lymphoma.org> (Haziran 2013).

8. ÖZGEÇMİŞ

İ. Cansu BARIŞ, 1987 yılında Dinar'da doğdu. İlköğretim ve liseyi Denizli'de okuduktan sonra, lisans öğrenimini 2005-2010 yılları arasında Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü'nde tamamladı. 2011 yılının Güz Dönemi'nde Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı.