

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MULTIPLE MİYELOM HÜCRELERİNDE LENTİVİRAL YÖNTEMLE *DEK* GENİ
İFADESİNİN SUSTURULMASI**

EMRAH ÖZÇELİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE

2015

**T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MULTIPLE MİYELOM HÜCRELERİNDE LENTİVİRAL
YÖNTEMLE *DEK* GENİ İFADESİNİN SUSTURULMASI**

**EMRAH ÖZÇELİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMANI
DOÇ. DR. AYTEN KANDİLCİ**

**GEBZE
2015**

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

**SILENCING OF DEK GENE EXPRESSION BY USING
LENTIVIRAL METHOD IN MULTIPLE MYELOMA
CELLS**

EMRAH ÖZÇELİK

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

**THESIS SUPERVISOR
ASSOC. PROF. DR. AYTEN KANDILCI**

**GEBZE
2015**



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 10/07/2015 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Emrah ÖZÇELİK'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Ayten Kandilci

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Can M. Erişti

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Naci Çine

ONAY

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

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Multiple Miyelom (MM), plazma hücrelerinin klonal olarak anormal çoğalmasıyla oluşan, 6. kromozomun 6p22.3 bölgesinin amplifikasyonunu da içeren çok sayıda kromozomal anomalinin görüldüğü bir kanser türüdür. 6p22.3 bölgesinde yerleşim gösteren *DEK* onkogeni, bu kromozom bölgesinin amplifikasyonu sonucunda bazı solid kanser türlerinde aşırı miktarda ifade edilmektedir. Daha önceki çalışmalarımızda, analiz ettiğimiz MM hastalarının CD138^{pozitif} MM hücrelerinde *DEK* ifadesinin 2-30 kat arasında azaldığı tespit edildi [Çakar T., 2014]. İlave olarak, analiz edilen MM hastalarının yaklaşık %10'unda *DEK* geninin amplifiye olmasına karşın *DEK* ifadesinin bu amplifikasyondan etkilenmediği ve bu hastalarda da *DEK* ifadesinin azaldığı belirlendi [Çakar T., 2014]. Bu tez çalışmasında, *DEK* geni ifadesinin lentiviral yöntemle kalıcı olarak baskılanmasının U266 MM hücre hattının morfolojisine, canlılığına, çoğalmasına ve kemoterapi ilacı Melphalan'a olan hassasiyetine etkileri analiz edildi.

Elde edilen sonuçlar, iki farklı lentiviral shRNA ile *DEK* ifadesi baskılanan hücrelerde, kontrol grubu hücrelerine göre bölünme süresinin yavaşladığını ve kontrol hücreleri (sh-negatif) bölünmelerini 43 saatte tamamlarken, bu sürenin shDEK-B hücrelerinde 45 saate, shDEK-C hücrelerindeyse 51 saate uzadığını gösterdi. Sadece shDEK-C hücrelerinde gözlenen bölünme süresindeki bu uzamanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($P < 0.05$). Giemsa ile boyanmış hücrelerin ışık mikroskobu analizleri hücrelerin benzer morfolojiye sahip olduklarını gösterdi. Kontrol hücreleri ve *DEK* ifadesi baskılanmış hücrelerde, MM hastalarının tedavisinde kullanılan Melphalan'a hassasiyetin değişmediği ve hücrelerin Melphalan varlığında çoğalmalarını durdurdukları tespit edildi. Bu veriler doğrultusunda, *DEK* ifadesinin U266 MM hücre hattında baskılanmasının, zaten yavaş olan hücre bölünme süresini biraz daha yavaşlattığı ancak hücre morfolojisi ve Melphalan hassasiyetini etkilemediği sonucuna varıldı. Bu tez çalışması Tübitak tarafından KBAG 212T108 no'lu 1001 projesi ile desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Multiple Miyelom, DEK, CD138, Lentiviral Transdüksiyon, Melphalan.

SUMMARY

Multiple myeloma (MM) is characterized by abnormal expansion of malignant plasma cells, representing several chromosomal abnormalities including the amplification of 6p22.3 chromosome region. *DEK* oncogene, located on chromosome 6p22.3, is overexpressed in several solid tumors due to amplification of chromosome 6 or 6p region. We previously showed that *DEK* expression is downregulated by 2-30 fold in CD138^{positive} MM cells in our cohort of MM patients, without being affected by the amplification of *DEK* gene, which is observed in about 10 % of our cohort [Çakar T., 2014].

In this thesis, we aimed to analyze the affect of DEK knock-down on the biology of U266 MM cell line. Silencing of DEK expression by two different lentiviral sh-RNA contracts (shDEK-B and shDEK-C) resulted in about 2 hours (shDEK-B) to 8 hours (shDEK-C) increase in the doubling time, the later increase was statistically significant ($P < 0.05$). Light microscopy analysis of Giemsa stained cells did not show any difference in morpghology of shDEK-B or shDEK-C cells compared with control sh-Negative cells. Melphalan treatment resulted in a similar response in the control and sh-DEK cells and induced growth arrest in all treated cells. In summary, our results suggest that the down regulation of DEK expression in U266 MM cells slightly increase the dobling time of the cells whereas it does not affect their morphology and Melphalan response. This work was supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBİTAK) 1001 Grant (KBAG 212T108).

Key Words: Multiple Miyeloma, DEK, CD138, Lentiviral Transduction, Melphalan.

TEŞEKKÜR

“Multiple Miyelom Hücrelerinde Lentiviral Yöntemle *Dek* Geni İfadesinin Susturulması” konulu tez çalışmasının seçiminde, yürütülmesinde, sonuçlandırılmasında, sonuçlarının değerlendirilmesinde ve bütün bu süreç boyunca akademik ve sosyal hayatta hiçbir zaman maddi ve manevi destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam sayın Doç. Dr. Ayten KANDİLCİ’ye sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında bana her daim destek olan, zaman harcayan, emek veren, tecrübesini paylaşan başta ekip arkadaşlarım Zihni Onur Çalışkener, Türkan Çakar ve Abdullah Abdul Wahhed olmak üzere, Metin Çetin, Merve Tuzlakoğlu Öztürk, Özge Arslan, , Ömer Güllülü’ye sonsuz teşekkür ederim.

Bütün hayatım süresince benim yanımda olan, ilk adımdan itibaren yürüdüğüm yolda tüm aksaklıklarda desteğini bulabildiğim canım aileme ve dostlukları ile cesaret veren arkadaşlarım; Burcu Çimen Beşikçioğlu, Hüseyin Erdinç Beşikçioğlu, Furkan Şenel’e yürekten teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, tanıdığım ilk andan beri kocaman yüreği ve sevgisi ile bana verdiği manevi destek, göstermiş olduğu sabır ve anlayıştan dolayı değerli eşim Eda YAZICI ÖZÇELİK’e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. HEMATOPOETİK KÖK HÜCRELER	2
3. B HÜCRESİ	4
3.1. B Hücreleri Gelişimi	4
4. PLAZMA HÜCRESİ	6
4.1. Plazma Hücrelerinin Gelişimi	6
4.2. Plazma Hücrelerinin Gelişiminde Etkili Transkripsiyon Faktörleri	7
4.3. Plazma Hücrelerinin Yaşam Alanı ve Plazma Hücrelerinin Sağ Kalımında Etkili Genetik Mekanizmalar	11
4.4. Plazma Hücrelerinin Fizyolojik Özellikleri	13
4.5. Plazma Hücrelerinin İmmünitedeki Rolü	14
4.6. Plazma Hücreleri Tümörü Kaynaklı Hastalıklar	14
5. MULTIPLE MİYELOM	16
5.1. Epidemiyolojisi	16
5.2. Seyri, Belirtileri ve Teşhisi	16
5.3. Gelişimi	17
5.4. Tedavisi	20
6. DEK PROTEİNİ	24
7. MATERYAL ve YÖNTEM	26
7.1. Materyal	26
7.2. Yöntem	30
7.2.1. Hücre Kültürü ve Hücrelerin Dondurularak Saklanması	30

7.2.2. Lentivirüs Üretilmesi ve Transdüksiyon	30
7.2.2.1. Transfeksiyon	30
7.2.2.2. Transdüksiyon	31
7.2.3. Transdükte Olmuş Hücrelerin FACS ile Ayrıştırılması	31
7.2.4. RT-qPCR	32
7.2.4.1. Total RNA İzolasyonu	32
7.2.4.2. cDNA Sentezi	32
7.2.4.3. qPCR	32
7.2.5. Western Blot Yöntemi ile Protein Analizi	33
7.2.5.1. Protein İzolasyonu	33
7.2.5.2. Protein Miktarının Belirlenmesi	33
7.2.5.3. SDS Jel Elektroforezi	34
7.2.5.4. Proteinlerin Jelden Membrana Transferi	34
7.2.5.5. Antikor Uygulaması	34
7.2.5.6. Görüntüleme	35
7.2.6. Proliferasyon Analizi	35
7.2.6.1. Trypan Mavisini ile Hücre Sayısı ve Canlılığının Tespiti	35
7.2.6.2. FACS ile Ayrıştırılmamış Hücrelerde Periyodik GFP Analizi	35
7.2.6.3. FACS ile Ayrıştırılmış GFP ^{pozitif} Hücrelerde Proliferasyon Analizi	36
7.2.7. Kemoterapi (Melphalan) İlacına Direncin Analizi	36
7.2.8. Giemsa Boyama	36
7.2.9. İstatistiksel Analiz	37
8. BULGULAR	38
8.1. U266 Hücrelerinde Kalıcı Olarak DEK İfadesinin Susturulması	38
8.2. <i>DEK</i> Geni Susturulan Hücrelerin Büyüme Eğrilerinin ve Bölünme Sürelerinin Belirlenmesi	45
8.3. Kemoterapik İlaç (Melphalan(10µM)) ile Muamele Edilen Hücrelerin Büyüme Eğrilerinin Belirlenmesi ve Canlılıklarının Karşılaştırılması	47
8.4. Giemsa Boyama ile Hücre Morfolojisi Analizi	49
9. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	51

KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	59
EKLER	60

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Açıklamalar

Kısaltmalar

CD19	: B-Lymphocyte Antigen CD19
CD21	: Complement Receptor Type 2
CD22	: B-Cell Receptor CD22
CD38	: ADP-Ribosyl Cyclase 1
CO ₂	: Karbondioksit
H ₂ O	: Su
Ig	: İmmünoglobülin
IGF-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL-3	: İnterlökin-3
IL-4	: İnterlökin-4
IL-5	: İnterlökin-5
IL-6	: İnterlökin-6
IL-10	: İnterlökin-10
kDa	: Kilodalton
ml	: Mililitre
ACTB	: Actin-Beta
AID	: Activation-İnduced Cytidine Deaminase
AML	: Akut Myeloid Lösemi
B220	: Receptor-Type Tyrosine-Protein Phosphotase C
BACH2	: Transcription Regulator Protein BACH2
BCL6	: B-Cell Lymphoma 6 Protein
BCMA	: B-Cell Maturation Protein
BCR	: B Hücresi Reseptörü
BLIMP1	: B-Lymphocyte-İnduced Maturation Protein 1
BMSCs	: Bone Marrow Stromal Cells
BSA	: Bovine Serum Albumin
CDKN1A	: Cyclin-Dependent Kinase İnhibitor 1

CLP	: Common Lymphoid Progenitor
CMP	: Common Myeloid Progenitor
CSR	: Class Switch Recombination
CXCL12	: Stromal-Cell-Derived Factor 1
CXCR4	: C-X-C Chemokine Receptor Type 4
D	: Çeşitli (Diverse)
DEXA	: Dual Energy X-Ray
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
E2F1	: Transcription Factor E2F1
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic Acid
EMP	: Extramedullary Plasmactomas
ER	: Endoplazmik Retikulum
FACS	: Fluorescence-Activated Cell Sorting
FBS	: Fetal Bovine Serum
FLC	: Serumda İmmunoglobülin Serbest Zincirleri
GFP	: Green Flourescent Protein
GM	: Germinal Merkez
H	: Ağır (Heavy)
HKH	: Hematopietik Kök Hücre
IMiDs	: İmmüno Modölatör İlaçlar
IRE1	: Endoplasmic Reticulum To Nucleus Signaling 1
IRF4	: İnterferon Regulatory Factor 4
J	: Katılım (Joining)
L	: Hafif (Light)
MCL1	: İnduced Myeloid Leukemia Cell Differentiation Protein Mcl-1
MGUS	: Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance
MHC	: Major Histocompatibility Complex
MM	: Multiple Miyelom
MÖH	: Multipotent Öncü Hücreler
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
MUC-1	: Mucin-1

MYC	: Myc Proto-onkogen Proteini
MZ	: Marjinal Zon
NCI	: Uluslararası Kanser Enstitüsü
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
NK	: Doğal Öldürücü Hücreler
OBF1	: OCT-Binding Factor 1
OCT	: Octamer-Binding Transcription Factor
PAX5	: Paired Box Protein 5
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PCA-1	: Plasma Cell membrane Glycoprotein PC-1
PCL	: Plazma Hücreli Lösemi
PDGF	: Platelet-Derived Growth Factor
RAG	: Recombination-Activating Gene
Rb	: Retinoblastoma
RNA	: Ribonükleik Asit
RT-qPCR	: Real Time Polymerase Chain Reaction
SHM	: Somatik Hipermutasyon
shRNA	: Short Hairpin RNA
SLC	: Surrogate L Chains
SLE	: Systemic Lupus Erythematosus
SMM	: Smouldering Multiple Myeloma
SPB	: Solitary Plasmacytomas
TBS	: Tris Buffered Saline
TLR	: Toll-Like Receptor
TNF	: Tumor Necrosis Factor
TNFSF13	: Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily Member 13
UPR	: Unfolded Protein Response
V	: Değişken (Variable)
VCAM-1	: Vascular Cell Adhesion Protein 1
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VLA-4	: Very Late Antigen 4
XBP1	: X-Box-Binding Protein 1

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Hematopoetik hücre gelişiminin hiyerarşisi.	3
3.1: B hücresi gelişimi.	5
4.1: Plazma hücresi gelişiminin hücrel aşamaları ve moleküler aracıları.	7
4.2: Plazma hücresi gelişiminde rol alan transkripsiyonel faktörler arası iletişim ağı.	11
4.3: Plazma hücrelerinin kemik iliğinde muhafaza edilmesi.	12
4.4: Plazma hücresinin sağkalımı için gerekli faktörler ve kaynaklar.	13
5.1: MM'nin Gelişim Yolağı.	19
5.2: MM hücresinin mikroçevresi ile etkileşimi.	20
5.3: Melphalanın kimyasal yapısı.	23
8.1: DEK'e özgün shRNA taşıyan vektörlerin genel yapısı.	39
8.2: 293T hücrelerinin lentiviral vektörle transfeksiyonu.	40
8.3: U266 hücrelerinin transdüksiyondan 72 saat sonra FACS ile GFP analizi.	41
8.4: Transdüksiyon sonrası GFP ^{pozitif} hücrelerinin ayrıştırılmasında kullanılan "gate"ler.	42
8.5: GFP ^{pozitif} hücrelerin FACS ile ayrıştırma sonrasında saflığının kontrol edilmesi.	43
8.6: GFP ^{pozitif} U266 hücrelerinde DEK mRNA seviyesinin RT-qPCR ile belirlenmesi.	44
8.7: Western blot yöntemi ile GFP ^{pozitif} sh-neg, shDEK-B ve shDEK-C hücrelerinde DEK protein miktarının belirlenmesi.	44
8.8: Lentiviral infeksiyondan sonra, FACS ile ayrıştırılmamış U266 hücrelerine 3, 6, 14, 20 ve 28. günlerde uygulanan periyodik GFP analizi sonuçları.	45
8.9: DEK geni baskılanmış U266 hücrelerinin bölünme süreleri.	46
8.10: DEK geni baskılanmış U266 hücrelerinin büyüme eğrileri.	47

- 8.11: Melphalan (10 μ M) muamelesi sonucunda kontrol grubu sh-neg., shDEK-B ve shDEK-C hücrelerinin canlı hücre sayısına göre büyüme eğrileri (Kontrol: melphalan'ın çözüldüğü çözücü (vehicle) ile muamele edilmiş örnekler). 48
- 8.12: Melphalan (10 μ M) muamelesi sonucunda sh-neg., shDEK-B ve shDEK-C hücrelerinin total hücre sayısına göre büyüme eğrileri (Kontrol: melphalan'ın çözüldüğü çözücü (vehicle) ile muamele edilmiş örnekler). 48
- 8.13: Melphalan (10 μ M) uygulanmış hücrelerin canlılık oranları. 49
- 8.14: U266, sh-neg., shDEK-B ve shDEK-C hücrelerinin Giemsa boyama ile boyanarak ters mikroskopta çekilmiş fotoğrafları (400X). 50

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
7.1: Hücre hatları.	26
7.2: Plazmitler.	26
7.3: Primer problemler.	26
7.4: Antikorlar.	26
7.5: Kitler, kimyasallar.	27
7.6: Cam, plastik ve sarf malzemeleri.	28
7.7: Cihazlar.	29
8.1: Dört bağımsız büyüme eğrisi ve bölünme zamanı deneyinden elde edilen hücre sayılarının aritmetik ortalaması alınarak (Canlı Hücre Sayısı/Total Hücre Sayısı×100) formülü ile belirlenen hücre canlılık oranları.	47

1. GİRİŞ

Multipl Miyelom (MM), anemi, kemik lezyonları, böbrek hasarı ve immün yetersizlikle ilişkilendirilmiş ölümcül bir plazma hücresi kanseridir [Shapiro-Shelef and Calame, 2004]. MM, monoklonal immunoglobulin salgılayan plazma hücrelerinin kemik iliğinde birikmesi ile karakterize edilmiştir [Leung-Hagesteijn et al., 2013]. Bunun yanısıra, MM hastalarının %90'ından fazlasında kromozomal anormallikler belirlenmiştir ve spesifik kromozom bölgelerinde sıklıkla translokasyonlar gözlemlenmektedir [Laubach et al., 2011].

Plazma hücresi gelişimi sırasında immunoglobülinlere (Ig) özgü gen segmentleri çeşitliliğinin oluşturulması sırasında DNA çift zincir kırıkları oluşur. Bu DNA kırıklarının tamir edilemediği durumlarda hasarlı genoma sahip, fakat klonal avantaj kazanan hücreler oluşabilir. MM'de sık karşılaşılan t(4;14), t(14;16), t(11;14) ve t(6;14) translokasyonlarının bu şekilde oluştuğu öne sürülmektedir [Morgan et al., 2012], [Raab et al., 2009]. Bu translokasyon bölgelerinin proto-onkogenler içerdiği ve bazı B hücre kanserlerinde fazlaca eksprese edildiği bilinmektedir [Mahindra et al., 2010]. DEK proteini de MM'de amplifikasyonuna rastlanan 6. kromozomun kısa kolunun 2. bölge 2. bant 3. alt-bant (6p22.3) bölgesinde yerleşim göstermektedir. DEK proteininin birçok kanser türünde fazla eksprese olmasının yanısıra, yüksek DEK ifadesinin tümör hücresi oluşumuna ve yaşamasına katkı sağladığı gösterilmiştir [Riveiro-Falkenbach and Soengas, 2010], [Saha et al., 2013].

Laboratuvarımızda daha önce yürüttüğümüz çalışmalarımızda, analiz ettiğimiz MM hastalarının (n=41) yaklaşık %10'unda (4/41) *DEK* geninin spesifik olarak CD138^{pozitif} MM hücrelerinde amplifiye olduğunu, *DEK* mRNA ve protein ifadesinin bu amplifikasyondan etkilenmeyerek *DEK* mRNA'sının MM hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığını ve CD138^{pozitif} MM hücreleri ve normal plazma hücrelerinde DEK proteininin immunohistokimyasal yöntemle tespit edilecek düzeyde ifade edilmediğini tespit ettik [Özdilek A., 2013], [Çakar T., 2014]. Daha önceki çalışmalarımızın devamı olarak bu tez çalışmasında, lentiviral yöntemle *DEK* geni ifadesinin baskılanmasının U266 MM hücre hattının çoğalma, bölünme ve morfolojik özelliklerine olan etkilerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

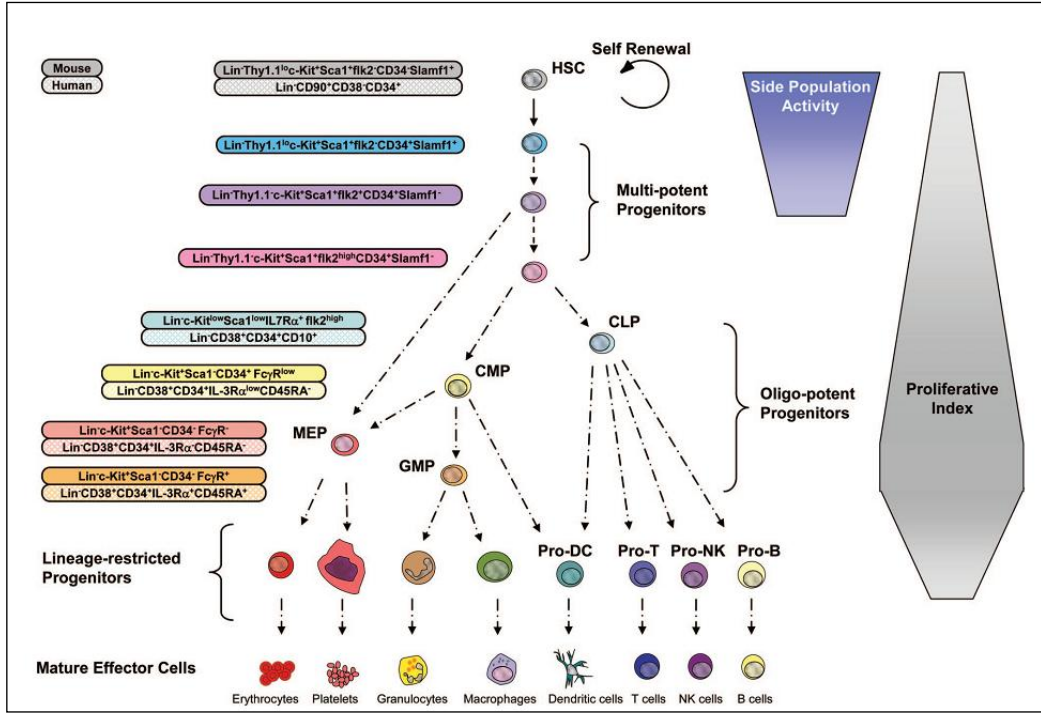
2. HEMATOPOETİK KÖK HÜCRELER

Hematopoetik kök hücreler (HKH), organizmanın yaşamı süresince ihtiyaç duyduğu bütün kan hücresi tiplerini meydana getirebilen kök hücrelerdir. HKH'lerin kendilerini yenileyebilme özellikleri sayesinde, organizmadaki HKH sayısının sabit tutulması sağlanmaktadır [Beerman et al., 2010].

Farklılaşmasını tamamlamış efektör kan hücreleri kısa ömürlü hücrelerdir. Yetişkin bir insanda günlük yaklaşık 10^{11} kadar kan hücresi üretilir. Bu kadar çok miktarda gereksinim olan ve kısa ömre sahip kan hücrelerin sürekli olarak üretilmesi gerekmektedir. HKH'ler tarafından çok miktarda kan hücresi üretilmesi yoğun homeostatik kontrol mekanizmaları gerektirmektedir [Beerman et al., 2010], [Bryder et al., 2006].

HKH'lerden efektör kan hücresi oluşumu hiyerarşik bir düzende gerçekleştirilmektedir. HKH'ler buldukları çevreden İnterlökin-3 (IL-3), İnterlökin-6 (IL-6) veya platelet-derived growth factor (PDGF) gibi sitokinlerden aldıkları sinyallerle farklılaşma sürecine girerler. HKH'lerin ilk ürünü olarak multipotent öncü hücreler (MÖH) üretilir. MÖH'ler HKH'ler gibi bütün kan hücresi tiplerine farklılaşma potansiyeline sahiptir ancak HKH'lere göre kendini yenileyebilme kapasiteleri daha sınırlı olan hücrelerdir [Bryder et al., 2006], [Cabrita et al., 2003].

MÖH'lerin farklılaşması ile oligopotent öncü hücreler meydana gelir. Bu hücreler MÖH'lere göre daha kısıtlı farklılaşma potansiyeline sahiptirler. MÖH'lerden oligopotent hücrelere geçişteki hiyerarşik düzende dallanmalar gerçekleşir. MÖH'lerin farklılaşması sonucu "Common lymphoid progenitor (CLP)" ve "common myeloid prgenitor (CMP)" olarak adlandırılan iki tip oligopotent hücre meydana gelir. Sonraki aşamalarda CLP hücreleri, B, T, dentritik ve doğal öldürücü hücreleri (NK); CMP'ler ise eritrosit, trombosit, granülosit ve makrofajları oluştururlar [Bryder et al., 2006].



Şekil 2.1: Hematopoetik hücre gelişiminin hiyerarşisi.

HKH'lerden itibaren başlayarak farklılaşma hiyerarşisi süresince oluşan hücrelerin mitotik aktiviteleri artarken, kendilerini yenileme kapasiteleri azalır. Böylece oldukça çok sayıda ihtiyaç duyulan olgunlaşmış kan hücrelerinin üretimi kolaylaştırılır. Bu şekilde HKH'ler fazla çoğalmaya zorlanmadıklarından dolayı DNA'da oluşabilecek mutajenik hasarlara karşı korunmuş olurlar ve sonradan üretilecek olgun kan hücrelerinde meydana gelebilecek hasarlar en aza indirilir [Bryder et al., 2006], [Cabrita et al., 2003]. Şekil 2.1' de hematopoetik hücre gelişiminin hiyerarşisi gösterilmiştir [Bryder et al., 2006].

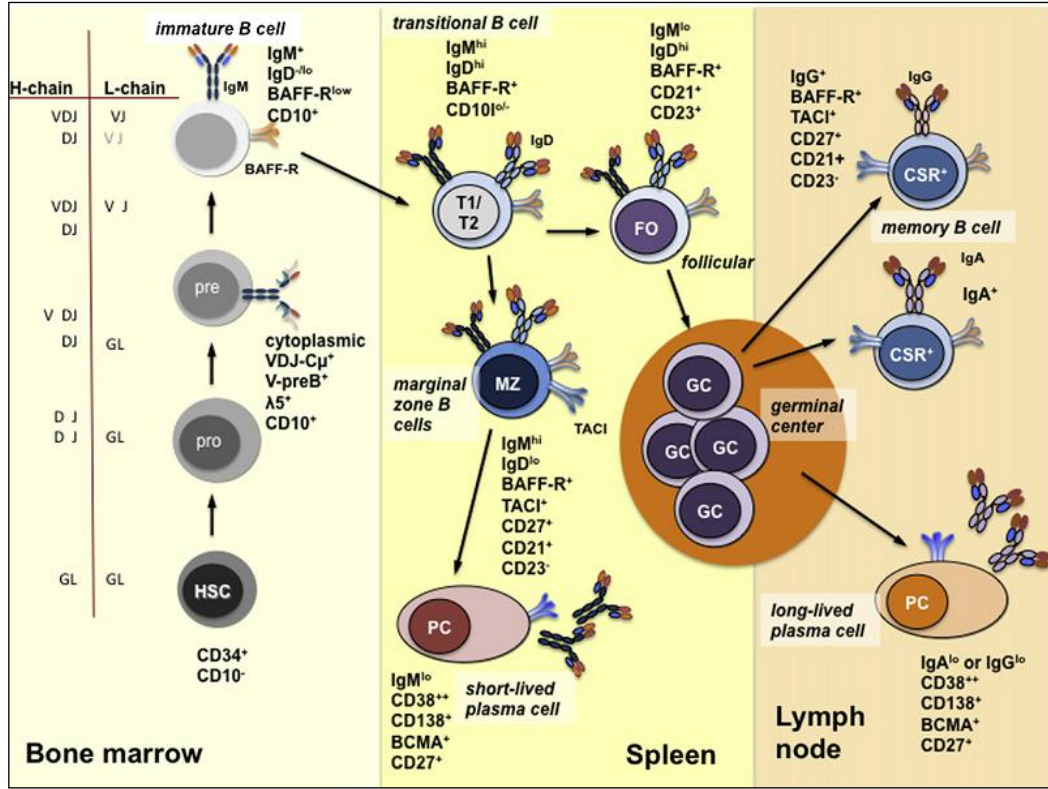
3. B HÜCRESİ

3.1. B Hücresi Gelişimi

B hücreleri, HKH'den köken alan ve bir program içinde olgunlaşarak yüzeyinde antijene özgü çok çeşitli Ig reseptörü bulunduran humoral immünite ve adaptif immünitede görev alan hücrelerdir [LeBien and Tedder, 2008], [Pieper et al., 2013].

Hematopoietik kök hücrelerden B hücresi gelişimi birincil lenfoid organlarda fetal zamanda karaciğer ve kemik iliğinde, yetişkin dönemde ise kemik iliğinde başlar. Bu süreçte fonksiyonel Ig gen segmentleri düzenlemeleri gerçekleşir [Pieper et al., 2013].

B hücresi gelişiminin üç adımda tamamlandığı belirlenmiştir. İlk adım, HKH'lerin pro-B hücrelerine farklılaşma sürecidir. Bu aşamada “recombination-activating (*RAG1/2*)” geni aracılığıyla Ig proteinlerinin ağır (heavy-H) zincirlerine özgü V,D ve J zinciri gen segmentleri düzenlenir. İkinci adımda, pro-B hücrelerinden pre-B hücreleri gelişimi sağlanır. Bu aşamada gelişimin devamında önemli rolü olan “surrogate L chains (SLC)” olarak adlandırılan heterodimer yapıda bir protein oluşturulur. Bu heterodimer yapısı $\lambda 5$ ve V-preB ismi verilmiş iki dimerden meydana gelir. SLC proteini pre-B cell receptor (BCR) formuna dönüşerek, *RAG1/2* geninin aktivitesine son verir. Bu sayede hücrede gen segment düzenlemeleri durur ve hücrenin çoğalması indüklenir. Bunun sonucunda bir veya iki kez bölünme geçiren hücrelerde tekrar *RAG1/2* geni aktive olur ve hafif (Light-L) zincire özgü V,D,J gen segmentlerinin düzenlenmesi gerçekleşir. Aynı zamanda *RAG1/2* aktivitesi ile V-preB/ $\lambda 5$ yapısının yerini κ veya λ L zinciri alır. Bu şekilde tamamlanan pre-B hücrelerinin gelişiminin ardından hücreler IgM salınımı yaparak IgM reseptörünü hücre yüzeyine gönderir. Yüzeyinde IgM reseptörü bulunduran hücreler artık olgunlaşmamış B hücreleri (immature B cell) olarak adlandırılır. Olgunlaşmamış B hücrelerinin kemik iliğini terkedip dalak gibi ikincil lenfoid organlara göçmesi ile B hücre gelişimi devam ettirilir [LeBien and Tedder, 2008], [Pieper et al., 2013].



Şekil 3.1: B hücre gelişimi.

İkincil lenfoid organlara göç eden olgunlaşmamış B hücreleri burada naif, folliküler veya marjinal zon (MZ) B hücrelerine farklılaşarak plazma hücresi gelişimi sürecine girerler [Pieper et al., 2013]. Şekil 3.1’de B hücre gelişimi şematik olarak anlatılmıştır [Pieper et al., 2013].

4. PLAZMA HÜCRESİ

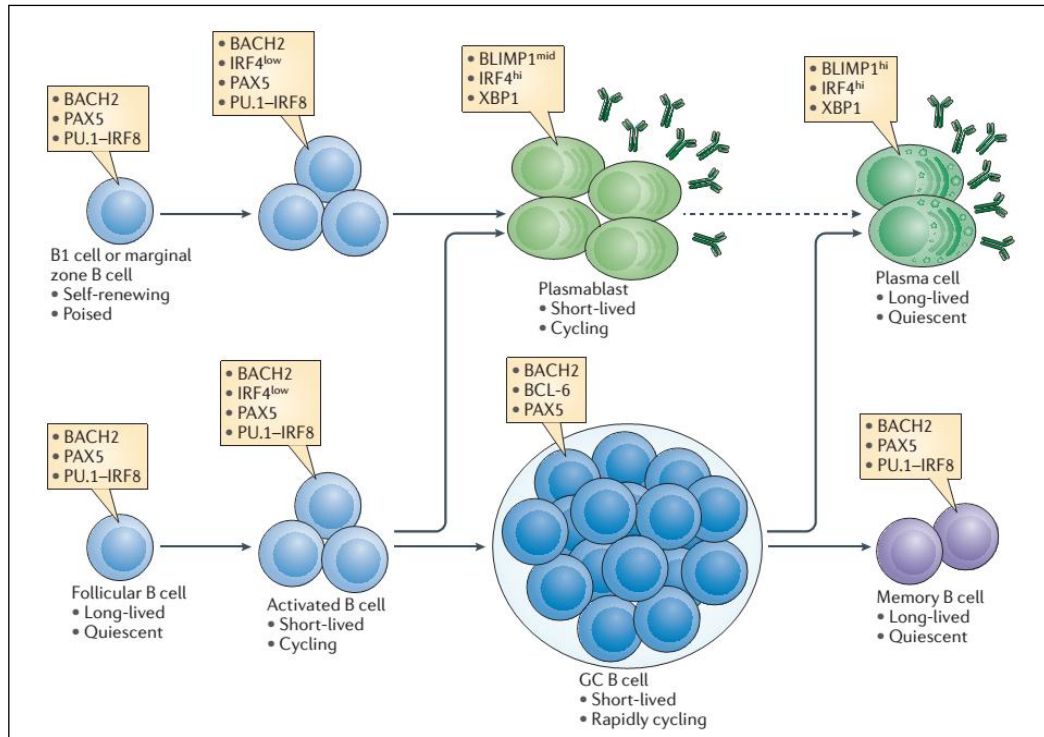
4.1. Plazma Hücresinin Gelişimi

Plazma hücresi, B hücrelerinden (B lenfositlerden) köken alan ve antikor salgılayan hücrelerdir. Bu hücreler bağışıklık sisteminin önemli bir parçası olan humoral cevabın son halkasını oluştururlar. [Calame, 2001], [Oliva and Cenci, 2014]. Folliküler B hücreleri, antijenle karşılaşılması sonucu, ikincil lenfoid organlarda plasmablast olarak adlandırılan ve antikor salgılayan hücrelere farklılaşır. Oluşan plazmablastlar, çeşitli dokularda farklılaşmasını tamamlayarak antikor salgılayan, fakat bölünme özelliğini kaybetmiş plazma hücrelerini meydana getirir [Alinikula and Lassila, 2011], [Oliva and Cenci, 2014]. Plazma hücrelerinin yaşam döngüsü, hücrelerin yer aldığı ve hayatta kalmasına yardımcı olan mikroçevre gibi etmenlerden etkilenerek farklılıklar gösterebilir [Alinikula and Lassila, 2011], [Nutt et al., 2011], [Oliva and Cenci, 2014].

Plazma hücresi gelişimi üretimi iki basamakta gerçekleşir [Nutt et al., 2015]. Follikül dışı cevap (Extrafollicular response) olarak bilinen ilk basamakta, antijenlerin Toll-Like Reseptör (TLR) veya B hücre reseptörlerine (BCR) bağlanmasıyla oluşan sinyaller B hücrelerini aktive eder. Aktive olmuş B hücreleri çoğalarak düşük afiniteli IgM antikoru salgılayan kısa-ömürlü hücreleri meydana getirir. Bu kısa ömürlü hücreler antijene karşı yapılan ilk savunmada görev alan hücrelerdir [Chu et al., 2011], [Nutt et al., 2015], [Shapiro-Shelef and Calame, 2004]. İkinci basamakta ise, özelleşmiş T yardımcı hücreleri aracılığı ile B hücreleri aktive edilir. Bu hücreler B hücre folliküllerine geri dönerek çoğalır ve germinal merkez (GM) denilen yapının oluşmasını sağlar. GM, bu hücrelerin farklılaşmadan önceki çoğalmasını tetikleyici reaksiyonlara ev sahipliği yapan bir bölgedir. Çoğalmanın ardından, GM'de V-bölgesel genlerdeki nükleotid değişimlerinin meydana getirdiği Somatik Hipermutasyon (SHM) ile antijen reseptörleri modifiye edilir. Bu şekilde farklılaşmasını tamamlamış olan hücreler, çok sayıda, yüksek afiniteli ve fazla miktarda antikor salgılama yeteneğine sahip uzun ömürlü plazma hücrelerini oluştururlar. GM'de plazma hücrelerinin yanı sıra hafıza-B (memory B cell) hücreleri de üretilir. Hafıza-B hücreleri, B hücresi fenotipi göstermesine rağmen,

aynı antijenle tekrar karşılaşılması durumunda çok hızlı bir şekilde plazma hücresine dönüşebilme yeteneğine sahiptir [Chu et al., 2011], [Nutt et al., 2015].

Uzun ömürlü plazma hücreleri çoğunlukla kemik iliğinde lokalize olurlar. Kemik iliği, plazma hücreleri için özelleşmiş bir yaşam nişi oluşturur ve bu hücrelerin aylarca hatta yıllarca antikör üreten hücreler olarak hayatta kalmasını sağlar [Chu et al., 2011], [Shapiro-Shelef and Calame, 2004]. Şekil 4.1’de plazma hücresi gelişiminin hücresel aşamaları ve moleküler aracılığı gösterilmiştir [Nutt et al., 2015].



Şekil 4. 1: Plazma hücresi gelişiminin hücresel aşamaları ve moleküler aracılığı.

4.2. Plazma Hücresinin Gelişiminde Etkili Transkripsiyon Faktörleri

Plazma hücresi gelişiminde bazı transkripsiyon faktörleri oldukça önemli bir yer tutar. Bu transkripsiyon faktörleri birbirine paralel veya zıt mekanizmalarla çalışarak, hücrenin uzun vadede B hücresi veya plazma hücresi özelliği kazanmasını sağlayan genlerin ekspresyon programını düzenlerler [Nutt et al., 2015], [Shapiro-Shelef and Calame, 2004].

Bir grup transkripsiyon faktörü olgun B hücrelerinde eksprese olarak, B hücresi gen ekspresyon programını devam ettirir ve plazma hücresine farklılaşma programını durdurur [Nutt et al., 2015].

Bunlardan biri olan Paired box protein-5 (PAX5) transkripsiyon faktörü, B hücresi gelişimi boyunca eksprese edilen bir proteindir. Pre-pro B hücreleri gibi lenfoid progenitör hücrelerde indüklenerek, B hücresi gelişiminin başlangıcında etkin rol alır. PAX5'in inaktivasyonu sonucu olgun B hücrelerinin, B hücresi kimliğini kaybettiği ve projenitör hücrelere dönüştüğü görülmüştür [Nutt et al., 2015]. PAX5, bütün B hücresi alt-tiplerinde hücrenin B hücresi kimliğini devam ettirmesini sağlar. Anı zamanda PAX5, olgun B hücrelerinin plazma hücresine farklılaşmasında baskılayıcı bir faktördür. B hücrelerinde X-box-binding protein 1 (XBP1) proteini hücrenin Ig salgılatan yapıların yayılmasını sağlar. PAX5, XBP1 proteinin ifadesini baskılayarak bir nevi bu hücrelerin plazma hücresi özelliği kazanmasına engel olur. Ayrıca PAX5, plazma hücresi gelişiminin önemli olaylarından olan Ig afinitesinin artırılması ve "class-switch recombination (CSR)" olayının gerçekleşmesi için GM'de plazma hücresi gelişiminin geciktirilmesini sağlayan proteinlerden biri olarak da iki yönlü etki gösterir [Alinikula and Lassila, 2011], [Calame, 2001], [Nutt et al., 2015], [Oracki et al., 2010], [Shapiro-Shelef and Calame, 2005].

Bu grupta yer alan diğer bir protein olan B-cell lymphoma 6 protein (BCL6) transkripsiyon faktörü, GM'de bulunan B hücrelerinde meydana gelen yüksek orandaki SHM toleransını arttırarak ve oluşabilecek DNA hasar cevabını inhibe ederek hücrelerin apoptoza uğramasını engeller ve bu hücrelerin hızlıca çoğalmasını kolaylaştırır. BCL6 proteini Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (CDKN1A), p53 (TP53) ve Myc proto-onkogen proteini (MYC) gibi hücre döngüsü düzenleyicilerinin ifadesini kontrol eden birçok gene bağlanarak bu işlevi yerine getirir. Bu protein CSR ve SHM olaylarının gerçekleştiği bölge olan GM oluşumunda da kritik bir rol oynar. *BCL6* geninin çıkarıldığı (knock-out) farelerle yapılan deneylerde, plazma hücresi oluşumunun gözlemlendiği, fakat GM'de ve plazma hücresi oluşumunda eksiklikler olduğu görülmüştür [Alinikula and Lassila, 2011]. BCL6 proteini B-Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1'i (BLIMP1) baskılayarak GM' de bulunan B hücrelerinin plazma hücrelerine farklılaşmasını bloke eder. BCL6'nın başka faktörlerce baskılanması sonucunda ise plazma hücresi farklılaşmasının önü açılmaktadır. İlginç olarak, kemik iliğinde bulunan plazma hücrelerinde BCL6 ifadesinin var olması; BCL6 proteininin, GM B hücreleri haricindeki B hücre alt-

tiplerinin farklılaşmasında kısıtlı rolü olduğuna işaret etmektedir [Alinikula and Lassila, 2011], [Nutt et al., 2015], [Nutt et al., 2011], [Oracki et al., 2010], [Shapiro-Shelef and Calame, 2004], [Shapiro-Shelef and Calame, 2005].

Başka bir faktör de, B hücresi farklılaşması boyunca ifade edilen ve ifadesi PAX5 tarafından pozitif olarak düzenlenen, transkripsiyonel baskılayıcı olarak fonksiyon gören transcription regulator protein BACH2'dir (BACH2). [Nutt et al., 2011]. Yapılan bir çalışmada, BACH2 ifadesi bakımından yoksun farelerde GM oluşumu, CSR ve SHM için gerekli aracı protein "Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID)" ifadesinin az olduğu görülmüştür [Muto et al., 2004]. BACH2'nin baskılanması hafıza B hücrelerinin plazma hücrelerine farklılaşma eğilimini arttıran bir faktördür. Plazma hücrelerinde BACH2 ifadesinin az olması da bu yargıyı kuvvetlendirmektedir. Bazı çalışmalarda BACH2'nin BCL6 ile birlikte BLIMP1 ifadesini baskıladığı bildirilmiştir [Nutt et al., 2015]. Bu yüzden BACH2'nin bu mekanizmalarla B hücresinden plazma hücrelerine geçişi geciktirdiği veya engel olduğu, hücrenin B hücresi özelliklerinin sürdürülmesinde rol aldığı söylenmektedir [Nutt et al., 2015], [Oracki et al., 2010], [Shapiro-Shelef and Calame, 2005].

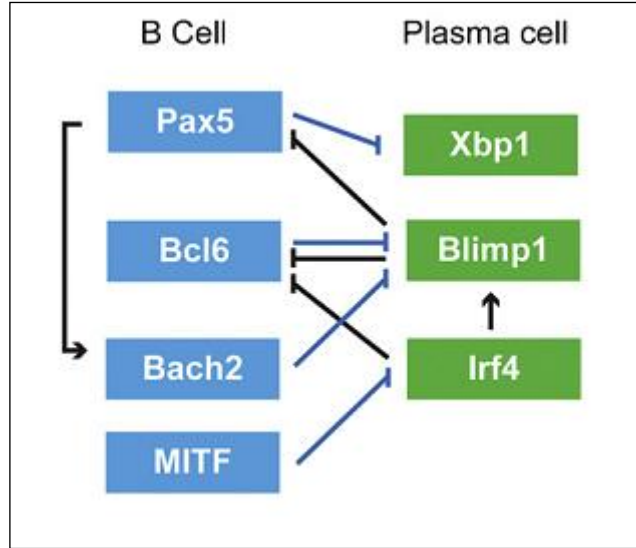
Octamer-Binding Transcription Factor (OCT) ve onun koaktivatörü OCT-Binding Factor 1 (OBF1), MZ B hücrelerinin ve B1 B hücrelerinin (sadece OCT2) gelişimi için gerekli faktörlerdir. T hücresi bağımlı B hücresi cevabında OBF1'den yoksun fareler üzerinde yapılan çalışmada, B hücrelerinin GM oluşumunu gerçekleştirmediği görülmüştür, bunu takiben de farelerde plazma hücresi oluşumunda hatalar saptanmıştır [Nutt et al., 2015]. Diğer bir çalışmada ise, OBF1'den yoksun B hücrelerinde plazma hücresi yüzey belirteci olan Syndecan-1 (CD138) ve BLIMP1 proteinlerinin erken sentezlendiği dolayısıyla farklılaşmasını tamamlamamış plazma hücresi oluşmasına neden olduğu belirtilmiştir [Nutt et al., 2011].

B hücrelerinin farklılaşarak plazma hücrelerine geçişleri üç önemli transkripsiyon faktörünün etkisiyle gerçekleştirilir [Nutt et al., 2015]. Bu faktörlerden birisi olan "Interferon regulatory factor 4 (IRF4)" bir multi-fonksiyonel transkripsiyonel düzenleyicidir ve birçok açıdan B hücresi farklılaşmasını kontrol eder. IRF4'ün fonksiyonu doza bağımlı olarak değişim göstermektedir. Düşük seviyede IRF4 varlığı bazı genlerin aktivasyonu ile birlikte GM yapısının sürdürülmesine ve bu bölgede bulunan B hücrelerinin plazma hücrelerine geçişinin geciktirilmesine neden olur. Hücrede yüksek seviyede IRF4 bulunması sonucunda

ise BCL6'nin baskılanması ve BLIMP1'in aktivasyonu sağlanarak plazma hücresi oluşumu kolaylaştırılır [Alinikula and Lassila, 2011], [Nutt et al., 2015], [Nutt et al., 2011].

Transkripsiyonel baskılayıcı BLIMP1 proteini, B hücresinden plazma hücresi gelişiminde anahtar bir faktördür. Bu protein plazma hücresi oluşumunun ileri basamaklarının tamamlanabilmesi için gereklidir. Plasmablastlar bölünebilme yeteneği gösteren hücrelerdir, fakat plazma hücrelerinde hücre döngüsü programı susturulmuştur. B hücresinden plazma hücresine geçişte bir ara basamak olarak oluşturulan plasmablastlarda BLIMP1 ifadesi plazma hücrelerindeki BLIMP1 ifadesinden daha azdır [Nutt et al., 2015]. BLIMP1'in seviyesinin artmasıyla, Transcription factor E2F1 (E2F1) ve MYC gibi hücre döngüsünde ve çoğalmasında rol alan faktörler, yada PAX5 ve BCL6 gibi B hücresi aktivasyonunda kilit görevleri olan proteinler direk olarak baskılanarak hücre bölünmesinin susturulup hücrenin plazma hücresi gelişimi yoluna girmesi sağlanır. Bunun yanında BLIMP1, XBP-1 gibi Ig salgılanmasında önemli bir proteinin ifadesini da arttırarak plazma hücresi gelişiminin tamamlanmasına yardım eder [Nutt et al., 2015], [Nutt et al., 2011], [Shapiro-Shelef and Calame, 2004].

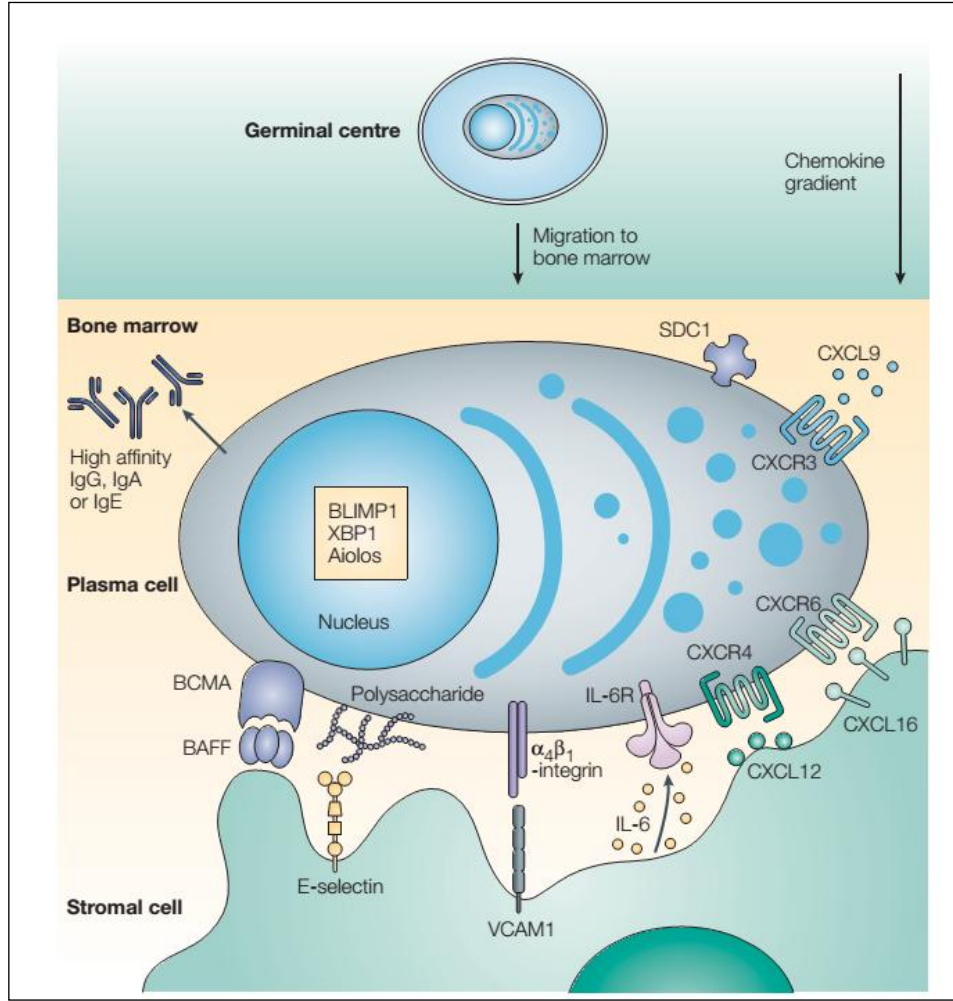
Plazma hücrelerinin çok miktarda Ig proteini sentezleyen hücreler olması, bu hücrelerde Endoplazmik Retikulum (ER) stresine bağlı olarak katlanmamış protein cevabının (Unfolded protein response; UPR) ortaya çıkmasına neden olur. Bu cevapta yer alan Endoplasmic Reticulum To Nucleus Signaling 1 (IRE1), XBP-1'in mRNA'sının kırılmasını sağlayarak hem daha aktif hem de daha stabil formda bir protein sentezlenmesini sağlar. Bu protein, diğer proteinlerin katlanmasında ve olgunlaşmasında görevli genleri aktive eder ve hücrelerde oluşabilecek hasarların engellenmesini sağlar. Ek olarak, plazma hücrelerindeki yüksek miktarda XBP1 ifadesi, bu proteini kodlayan *XBPI* genini MM' ye yönelik tedavilerde hedef bir gen haline getirmiştir. Son yapılan çalışmalarda ise, XBP1' in MM' de tümör baskılayıcı bir fonksiyonu olduğu söylenmektedir [Nutt et al., 2015], [Nutt et al., 2011], [Shapiro-Shelef and Calame, 2004]. Şekil 4.2'de plazma hücresi gelişiminde rol alan transkripsiyon faktörleri arasındaki iletişim ağı gösterilmiştir [Nutt et al., 2011].



Şekil 4. 2: Plazma hücresi gelişiminde rol alan transkripsiyon faktörleri arasındaki iletişim ağı.

4.3. Plazma Hücresinin Yaşam Alanı ve Plazma Hücresinin Sağkalımında Etkili Genetik Mekanizmalar

Sağlıklı bireylerde çok az sayıda dalakta görülebilse de, plazma hücrelerinin temel yaşam alanı kemik iliğidir. Hastalık durumlarında lenfoid ve lenfoid olmayan organlarda da plazma hücresi bulunduğu bildirilmiştir. Plazma hücreleri kemik iliği mikroçevresinden uzaklaştıklarında hızla ölürlere, ama şartlar uygun olduğunda bu bölgede aylarca hatta yıllarca canlı kalabilirler [Nutt et al., 2015]. Plazma hücrelerinin kemik iliğine göçü ve orada muhafaza edilme mekanizması hala tam olarak anlaşılamamıştır [Nutt et al., 2015]. Plazma hücrelerinin kemik iliğinde kalması ve orada muhafaza edilmesi için Stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) ve onun reseptörü C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4) oldukça önemli faktörlerdir. Kemik iliğindeki plazma hücreleri $\alpha_4\beta_1$ -integrin ekspres eder ve bu integrin stroma hücresi yüzeyinde bulunan Vascular cell adhesion protein 1'e (VCAM1) bağlanır, ayrıca stroma hücresi yüzeyindeki E-selektin'in de plazma hücresi yüzeyindeki polisakkaritlere bağlanması yoluyla plazma hücresinin kemik iliğinde kalması desteklenir [Nutt et al., 2015], [Shapiro-Shelef and Calame, 2005]. Şekil 4.3'te plazma hücrelerinin kemik iliğinde muhafaza edilmesi şematize edilmiştir [Shapiro-Shelef and Calame, 2005].

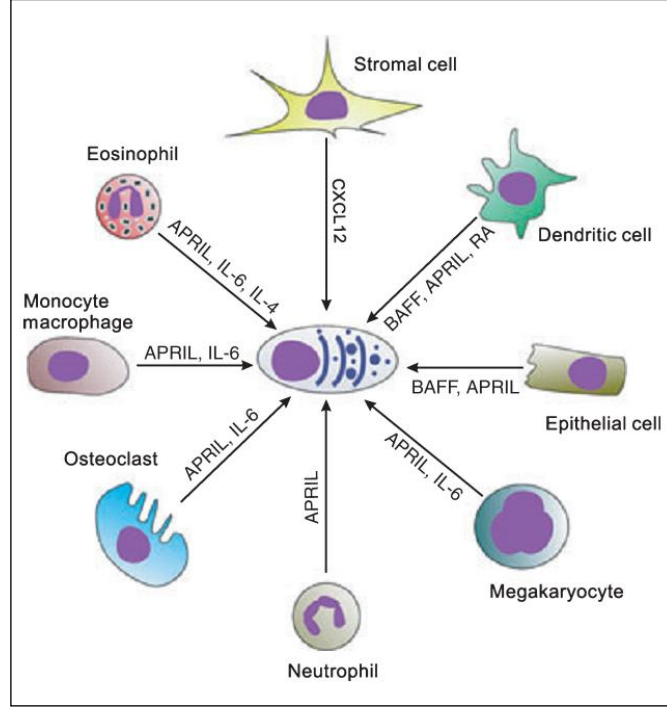


Şekil 4. 3: Plazma hücrelerinin kemik iliğinde muhafaza edilmesi.

Plazma hücrelerinin kemik iliğinde sağ kalımı için birçok faktörün aracılık ettiği bildirilmiştir. Kemik iliği mikroçevresi bu faktörlerin plazma hücresine ulaşmasını sağlar. Bu bölgede yer alan stroma hücreleri ile plazma hücrelerinin fiziksel teması sonucu salınımı gerçekleşen komponentler plazma hücresinin sağ kalımını güçlendirir. Bu komponentlerin en önemlilerinden olan “Tumor necrosis factor ligand superfamily member 13 (TNFSF13,APRIL)” ve onun reseptörü B-Cell Maturation Protein (BCMA) etkileşimi ile ortaya çıkan sinyaller, plazma hücrelerinin sağ kalımı için vazgeçilmez bir unsur olan “anti-apoptotik protein Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1’in (MCL1)” ifadesini sağlar [Nutt et al., 2015], [Oracki et al., 2010], [Shapiro-Shelef and Calame, 2005].

Plazma hücresinin sağ kalım süresinin uzamasında interlökin 4 (IL-4), interlökin 5 (IL-5) veya interlökin 10 (IL-10) gibi sitokinler, Tumor necrosis factor (TNF) ve CD44 ligandı da bulunmaktadır [Chu et al., 2011], [Shapiro-Shelef and

Calame, 2005]. Plazma hücrelerinin sağ kalımı için gerekli bu faktörler kemik iliği mikroçevresinde yer alan birçok kaynaktan sağlanmaktadır [Chu et al., 2011]. Şekil 4.4, plazma hücrelerinin sağkalımı için gerekli faktörler ve kaynakların şematik gösterimidir [Chu et al., 2011].



Şekil 4. 4. Plazma hücrelerinin sağkalımı için gerekli faktörler ve kaynakları.

4.4. Plazma Hücrelerinin Fizyolojik Özellikleri

Plazma hücreleri farklılaşmasını tamamlamış ve bölünme özelliklerini kaybetmiş hücrelerdir. Bu hücrelerde immüoglobülin ağır zinciri, hafif zinciri ve J zincirinin sentezinde kullanılmak üzere mRNA seviyesi önemli ölçüde artmıştır. Oldukça fazla olan mRNA'ların transkripsiyonuna ve oluşan ürünlerin salınımına yer sağlamak için plazma hücrelerinin sitoplazmik alanları, granüllü endoplazmik retikulum miktarı ve vakuollerin hacimleri de artmıştır [Calame, 2001].

Plazma hücresi yüzeyinde, B hücrelerine özel olan major histocompatibility complex (MHC) class II, Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C (B220) , B-lymphocyte antigen CD19 (CD19), Complement receptor type 2 (CD21) ve B-cell receptor CD22 (CD22) gibi birçok proteininin ifadesi azalmış veya yok olmuş; CD138, ADP-ribosyl cyclase 1 (CD38) ve Very Late Antigen-4 (VLA-4)

proteinlerinin ise miktarı oldukça artmıştır. Hücre yüzeyinde çok miktarda bulunmasından ötürü CD138 plazma hücresi yüzey belirteci olarak kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak, plazma hücrelerinde B hücresi gelişiminin erken safhalarında gerekli birçok transkripsiyon faktörünün ifadesi ya çok azdır ya da hiç yoktur [Calame, 2001], [Caraux et al., 2011], [Jourdan et al., 2011].

4.5. Plazma Hücresinin İmmüitedeki Rolü

Plazma hücresi tarafından üretilen antikorlar spesifik olarak hedef patojene bağlanır. Antikorum patojene bağlanmasıyla patojenin ilk olarak enfeksiyon özelliği ortadan kaldırılır. Bu yolla nötralize olan patojenler aynı zamanda fagositoz aracılığı ile yok edilmeleri için işaretlenmiş de olurlar. Humoral immunitenin son halkası olan plazma hücreleri sayesinde vücut içindeki patojenler etkin bir şekilde elimine edilirler [Abbas et al., 2010].

4.6. Plazma Hücresi Tümörü Kaynaklı Hastalıklar

Plazma hücrelerinin bazı hastalıkların oluşumunda etkili olduğu bilinmektedir. Bu hastalıkların bir bölümünü içeren otoimmün hastalıkların, kronik inflamasyon bölgelerinde bulunan ve kendi kendine aktivite gösteren hasarlı plazma hücrelerinin otoantikor üretimi sonucu ortaya çıktığı savunulmaktadır. Bir otoimmün hastalık olan Systemic lupus erythematosus'de (SLE), hasarlı plazma hücreleri tarafından üretilen otoantikorlar vücutta dolaşp akciğer ve karaciğere geçerek bu organlarda hasara yol açarlar [Oracki et al., 2010], [Shapiro-Shelef and Calame, 2004]. Plazma hücrelerinin tümör hücresine dönüşmesi sonucunda ortaya çıkan hastalıklar ise dört grupta kategorize edilmiştir. Solitary plasmacytomas of the bone (SPB) ve extramedullary plasmacytomas (EMP) olarak adlandırılan iki grup hastalık toplam plazma hücresi neoplazmalarının %5-8 kadarını kapsamakta ve az sıklıkta görülmektedir. Bu iki grup hastalık vücudun belli alanlarında lokalize olmuş hücre toplulukları şeklinde kendini göstermektedir. Diğer iki grubu oluşturan multiple miyelom ve plazma hücreli lösemnin (plasma cell leukemia (PCL)), SPB ve EMP'nin devamı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir ve bu iki hastalık da yayılmış lezyonlar şeklinde tanımlanmaktadır [Nolan et al., 2005].

MM hücrelerinin yüzeğinde bulunan CD38 ve plazma cell membrane glycoprotein pc-1 (PCA-1) gibi antijenlerin aynı zamanda normal plazma hücrelerinde de bulunması, hastalığın plazma hücrelerinden kaynaklandığı teorisini desteklemektedir. Farklı çalışmalarda ise MM hücrelerinde bulunan bazı yüzey antijenlerinin, B hücresinin plazma hücresine farklılaşmadan önceki safhalarında da bulunduğu belirtilmekte olup MM'nin hücresel kökeni hakkındaki tartışmalar devam etmektedir [Mahindra et al., 2010], [Shapiro-Shelef and Calame, 2004].

5. MULTIPLE MİYELOM

5.1. Epidemiyolojisi

MM, tüm kanser ölümlerinin %2' sini, hematolojik kanserlerden kaynaklı ölümlerinde %19'unu oluşturan bir kanser türüdür [Mahindra et al., 2010]. MM hastalığının görülme oranı yaşa bağlı olarak artmaktadır. Teşhis konulan hastaların ortalama yaşı 65 civarı olup, %10 kadarı 50 yaş altı ve ancak %2 kadarı 40 yaş altındadır. MM'nin gelişme riski, hastalığa sahip kişilerin birinci dereceden akrabalarında diğer kişilere nazaran 3.7 kat daha fazladır [Mahindra et al., 2010]. Hastalığın görülme sıklığı kadınlara oranla erkeklerde daha fazladır ve Afrika kökenli Amerikalılarda farklı kökenli kişilere göre 2 kat yüksektir [Kuehl and Bergsagel, 2002]. Klasik tedaviler sonrası hastaların ortalama yaşama süreleri 3-4 yıl kadar iken, yüksek doz tedavileri takiben yapılan kök hücre nakli ile bu süre 5-7 yıla kadar uzayabilmektedir [Raab et al., 2009].

5.2. Seyri, Belirtileri ve Teşhisi

MM'de birbirinden farklı, çeşitli klinik fazlar görülse de hastalığın çoğunlukla Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS) ve Smouldering Multiple Myeloma (SMM) olarak adlandırılan rahatsızlıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir [Mahindra et al., 2010], [Morgan et al., 2012]. 50 yaş üzeri kişilerin yaklaşık %3-4'ünde MGUS özellikleri görülmektedir [Rajkumar et al., 2014].

MM'nin ön aşaması kabul edilen MGUS ve SMM'de, MM'de görülen klinik belirtiler görülmez, fakat üç klinik fazda da benzer genetik bozukluklar ve kemik iliğindeki plazma hücre sayısının artışı göze çarpmaktadır. Kromozomal anormallikler gibi genetik bozuklukların ve kemik iliğindeki plazma hücresi sayısının MGUS'tan MM'ye doğru arttığı belirlenmiştir [Mahindra et al., 2010], [Morgan et al., 2012], [Rajkumar et al., 2014], [Shapiro-Shelef and Calame, 2004].

MGUS ve SMM teşhisinde, intramedüller bölgelerdeki monoklonal plazma hücresi, kandaki M-proteini, kandaki kalsiyum oranları ve anemi kriterleri göz önünde bulundurulur. Bu bölgelerde %10'un altında tümör hücresi bulunduran ve klinik belirti göstermeyen hastalara MGUS, %10'dan fazla tümör hücresi olan ve

klirik belirti göstermeyenlere SMM (%60 üzeri yüksek risk ve 2 yıl içinde %95 oranında MM oluşumu var) teşhisi konulur. %10'dan fazla tümör hücresi bulundurmasının yanında osteolitik lezyonlar gibi komplikasyonlar gösteren hastalar ise MM hastası olarak değerlendirilir. Bunların dışında son yıllarda geliştirilen; serumda immünoglobulin serbest zincirleri (FLC), immünofiksasyon elektroforezi, B2- microglobulin, laktat dehidrojenaz analizleri, MRI, FISH dual energy X-ray (DEXA) gibi ileri teknikler kullanılarak hastalığın aşaması hakkında daha detaylı bilgiler elde edilmektedir [Dimopoulos and Terpos, 2010], [Kuehl and Bergsagel, 2002], [Laubach et al., 2011], [Rajkumar et al., 2014]. MGUS ve SMM teşhisi konulan hastaların takibi çalışmalarında, MGUS hastalarının yaklaşık %1'inde, SMM hastalarının da yaklaşık %10'unda ileri dönemlerde MM'nin geliştiği görülmüştür [Laubach et al., 2011].

MM'nin klinik belirtileri; kemik lezyonları, kan hücresi yapımının bozulması ve hiperviskozite, böbrek yetmezliği, enfeksiyon, periferik nöropati gibi çok farklı şekillerde kendini gösterebilir [Dimopoulos and Terpos, 2010].

5.3. Gelişimi

MM'nin tam olarak nedeni bilinmemekte olup, normal B hücresi gelişiminin anlaşılması, adezyon molekülleri, sitokinler ve kemik iliği stroma hücrelerinin fonksiyonlarına dair moleküler detayların belirlenmesine yönelik araştırmalar MM'nin patogenezinin anlaşılmasında oldukça büyük öneme sahiptir [Mahindra et al., 2010].

MM hücrelerinin yüzeyinde, normal plazma hücrelerinin yüzeyinde bulunan CD38 ve PCA-1 gibi yüzey antijenlerinin bulunması, MM'nin plazma hücresinden kaynaklandığını düşündürmektedir. Buna karşılık MM hücrelerinde öncü B hücrelerindeki belirteçlerden de bulunması, MM gelişimindeki onkogenik olayların öncü B hücrelerinden itibaren ortaya çıktığını akla getirmektedir. Bir glikoprotein antijen olan Mucin-1'in (MUC-1) ise sadece MM hücrelerinde bulunmaktadır. Sonuç olarak hastalığın orijini hakkında tartışmalar halen devam etmektedir [Mahindra et al., 2010].

İnsan, yaşamı boyunca efektif bir immün sistem sayesinde enfeksiyonlara karşı korunmaktadır. Bu efektif immün sisteminin sonucu olarak ortaya çıkan genetik

düzenlemelerin yaşam boyu birikmesi ile B hücresi tümörü riski de artmaktadır. 50 yaş üzeri kişilerin %3'ünden fazlasının MGUS özelliği göstermesi bu teoriyi destekler niteliktedir [Merlini, 2014].

Plazma hücrelerinin oluşumu aşamasında meydana gelen DNA çift zincir kırıklarının çoğu doğru şekilde tamir edilse de, bazı DNA parçaları genomda herhangi bir yere yerleşebilir. Bu şekilde oluşan hasarlı genoma sahip hücrelerin bazıları onkogenik düzensizliklerle klonal çoğalma avantajı kazanabilmektedir . MM'de sıklıkla görülen genetik bozukluklardan olan translokasyonların bu şekilde oluştuğu düşünülmektedir [Morgan et al., 2012].

MM hastalarında sıklıkla IgH translokasyonları bulunmaktadır. Bu translokasyonlar 14. kromozom üzerinde yoğunlaşmıştır. En sık karşılaşılan translokasyonlar t(4;14), t(14;16), t(11;14) ve t(6;14) translokasyonlarıdır [Raab et al., 2009].

MM hastalarında karşılaşılan bazı translokasyon bölgelerinin proto-onkogenler içerdiği ve bu proto-onkogenlerinde B hücre kanserlerinde fazla ifade edildiği bulunmuştur. Bu nedenle MM oluşumunda bu translokasyonların rol alabileceği düşünülmektedir [Mahindra et al., 2010].

GM'deki B hücrelerinin plazma hücresine farklılaşması sürecinde hücreler bölünemeyen hücrelere dönüşürler. Bu dönüşüm hücre döngüsünün durdurulması, kromatin yoğunlaşması ve hücre fonksiyonlarının susturulması anlamına gelmektedir. Bu süreçlerde bir çok genin ve protein yollarının düzenlenmesinin bozulma riskinin artması kötü huylu tümör oluşma olasılığını arttıran bir faktördür [Morgan et al., 2012].

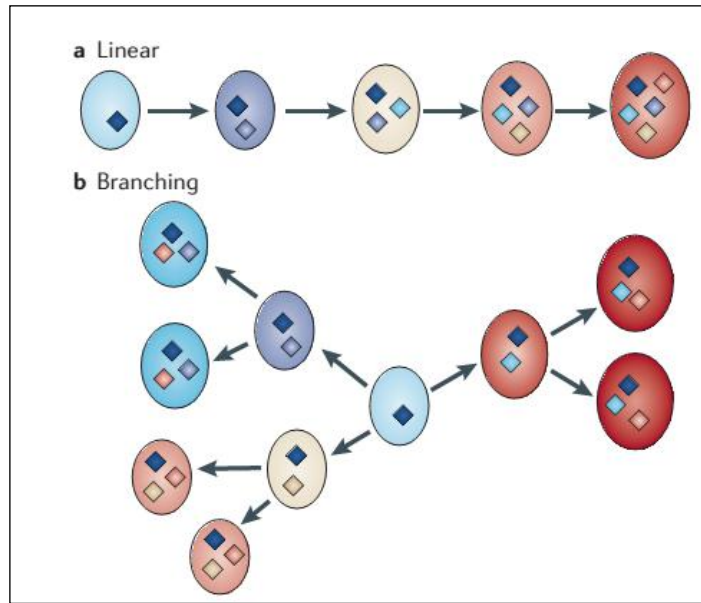
MM'de yapılan gen sekans analizlerinde XBP1, IRF4 ve BLIMP1 genlerinin üçünde de şaşırtıcı biçimde mutasyon görülmüştür. Mutasyona uğrayan bu üç faktörün MM tümör hücrelerinin yaşaması için gerekli faktörler olduğu düşünülmektedir [Leung-Hagesteijn et al., 2013], [Nutt et al., 2015].

Plazma hücresi gelişiminde etkili olan transkripsiyon faktörü XBP1'in tümör hücresi oluşumunda rolü olduğu bildirilmiştir. Yapılan araştırmalarda daha ağır klinik belirtiler gösteren hastalarda XBP1 proteinin fazla eksprese olduğu gösterilmiştir [Carrasco et al., 2007].

IL-6, TNF α , vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) gibi sitokinler, kanserli hücrelerin proliferasyonunu, yaşamasını, ilaç dirençliliğini, kemik iliğinde oluşan kemik lezyonlarını indükleyerek

MM'nin gelişiminde anahtar role sahiptirler [Shapiro-Shelef and Calame, 2004]. MM'nin gelişimi sırasında *MYC, NRAS, KRAS, FGFR3, TP53, RBI, CDKN2A* ve *CDKN2C* gibi birçok gende mutasyonlar da görülmektedir [Raab et al., 2009].

Hastalığın başlamasının ardından hastalığın gelişiminde gerekli moleküler olaylar düz bir rotada değil, Darwin'in açıkladığı türlerin evrimleşmesi modeli gibi dallanarak bir rota izlemektedir. Bu modele göre, rastgele oluşan mutasyonlar sayesinde klonal avantaja sahip hücreler meydana gelerek seçilir [Anderson et al., 2011]. Şekil 5.1' de şematize edilen bu model aynı zamanda hastalığın tedavisinde farklı kişilerde farklı cevaplar oluşmasını veya ilaçlara karşı direnç kazanılmasını da açıklayabilir [Morgan et al., 2012].

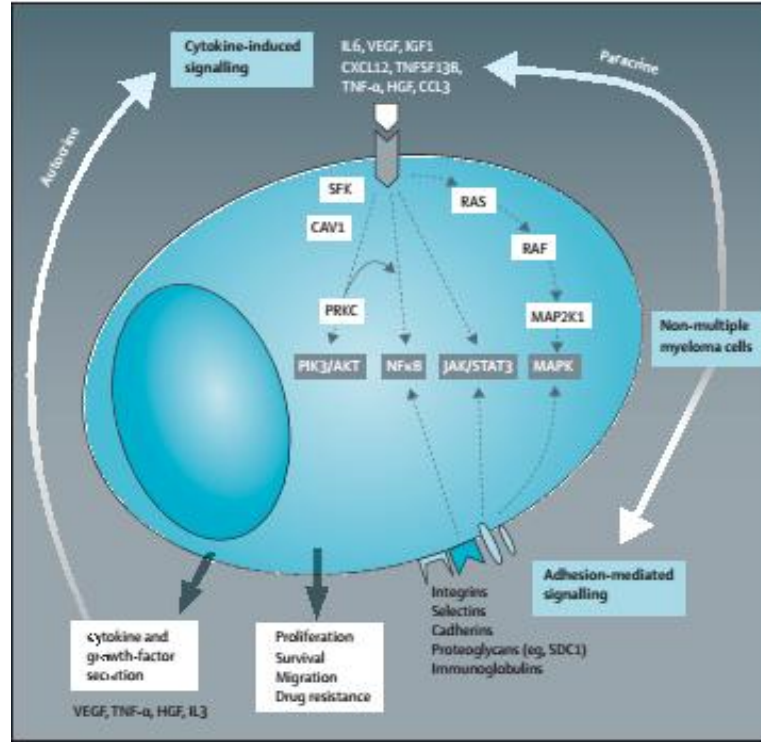


Şekil 5. 1: MM'nin gelişim yolağı.

MM hücrelerinde, VEGF gibi kan damarı oluşumunda yer alan öncü moleküllerin indüklendiği görülmüştür. Bu molekülün hastalığın ilerlemesi ile ilişkilendirilmiş olan kemik iliği dokusunun yoğunlaşmasına neden olduğu bulunmuştur [Raab et al., 2009].

MM hücreleri kemik iliğinde lokalize olmuştur. Kemik iliğindeki MM hücreleri kemik iliği stroma hücreleri (bone marrow stromal cells; BMSCs) ile hücre yüzeyi proteinleri aracılığı ile etkileşime girer [Raab et al., 2009]. Plazma hücresi yüzeyindeki $\alpha_4\beta_1$ -integrin ile stroma hücresi yüzeyindeki VCAM1 proteinin etkileşime girmesi sonucu, plazma hücresindeki hücre döngüsü düzenleyicisi CCND

proteini, anti-apoptotik BCL2 proteini ve telomeraz aktivitesi artar. Bu etkileşimle BMSCs’lerde de IL-6, TNF ve NF- κ B ligandlarının salınımı artar. Böylece MM hücrelerinin çoğalması hızlanır, apoptoza girmesi engellenir, ilaç dirençliliği artar [Dimopoulos and Terpos, 2010], [Raab et al., 2009]. Şekil 5. 2’de MM hücrelerinin mikroçevresi ile etkileşimi şematize edilmiştir [Raab et al., 2009].



Şekil 5. 2. MM hücrelerinin mikroçevresi ile etkileşimi.

5.4. Tedavisi

MM tedavisinde kullanılacak yöntemlerin belirlenmesinde hastanın yaşı, sağlık durumu, kök hücre nakline uygunluğu, hastalığın klinik özellikleri ve evresi gibi faktörler önem taşımaktadır [Laubach et al., 2011].

MM’ye sebep olan plazma hücreleri homojen özellikte olmadığından MM’de tek-tip hücreden ziyade farklı karakterdeki hücreleri hedefleyen tedaviler kullanılması önem kazanmaktadır [Morgan et al., 2012].

MM tedavisinde yüksek doz ilaç uygulaması ile birlikte kök hücre nakli oldukça başarılı sonuçlar verebilmekte ve bu hastaların yaşam süreleri klasik kemoterapi tedavisi alan hastalara göre daha uzun olduğu bildirilmektedir [Raab et al., 2009].

MM'de optimal tedavi, risk durumuna bağılı oluşturulan tedavilerdir. Optimal tedaviler, spesifik moleküler lezyonlar belirlenerek kişiye özel olarak dizayn edilerek başarılabilir. Bu tür uygulamalarda ortaya çıkabilecek en önemli sorun, klon içi çeşitliliğin tedaviye direnç göstermesidir. Bu sorun göz önünde bulundurularak, başlangıç tedavisiyle azaltılan hastalığın şiddeti, başlangıç sonrası tedavilerle birlikte minimum düzeyde tutulmalıdır [Morgan et al., 2012].

Düşük risk grubundaki hastalarda uygulanan immüno modülatör ilaçların (IMiDs) etkili olduğu ve hastaların yaşam sürelerini büyük oranda arttırdığı görülmüştür. Yüksek risk gruplarında ise IMiDs'ler çok fazla yarar sağlamamaktadır [Morgan et al., 2012].

Son zamanlarda, MM tedavisinde MM hücrelerinin yanında BMSCs'ler, endotelial hücreler, sitokinler, büyüme faktörleri ve özel sinyal yolları da terapötik hedefler olarak belirlenmektedir [Raab et al., 2009]. Thalidomide, lenalidomide ve bortezomib gibi ilaçların, kemik iliği mikroçevresinin MM hücrelerine sağladığı avantajı azalttığı gösterilmiştir [Raab et al., 2009]. Bu ilaçlardan thalidomide anti-anjiyojenik özellik göstererek kemik iliği yoğunluğunu azaltır. Lenalidomide, thalidomide'e benzer kimyasal yapıdadır ve daha az yan etkiye sahip olduğu söylenmektedir. Lenalidomide, MM hücrelerinde apoptozu indükler, kemik iliği yoğunluğunu azaltır ve tümör baskılayıcı CD4⁺/CD8⁺ T hücrelerini aktive eder. Lenalidomide kullanımında hastaların kan seviyeleri rutin olarak takip edilmelidir. Bortezomib, ubiquitin-proteozom yolağını inhibe ederek hücre döngüsünü kontrol altına alır, apoptozu indükler ve IL-6 salınımını azaltır [Laubach et al., 2011], [Raab et al., 2009].

MM tedavisinde kullanılan proteozom inhibitörleri (PI), doğru katlanmamış proteinlerin bir araya gelerek hücrenin ER stresi oluşturmasına sebep olurlar. PI'lar aynı zamanda hücrede ER stresine karşı ortaya çıkan katlanmamış protein cevabını (UPR) inhibe edebilirler. UPR'de görev alan IRE1 ve XBP-1 faktörlerinin bir PI olan PS-341 tarafından baskılanması buna örnek olarak gösterilebilir. Bu tip ilaçlarla, ER stresi ve UPR inhibisyonu aracılığıyla MM hücrelerinin apoptoza girmesi ve ölmeleri hedeflenerek tedavi oluşturulur [Shapiro-Shelef and Calame, 2004].

MM'nin öncüsü olarak kabul edilen SMM hastalarında erken tedavi uygulamaları hastalığın gelişimini geciktirmek için kullanılabilir [Morgan et al., 2012]. Yeni teşhis konulmuş hastaların tedavisinde genellikle anti-anjiyojenik aktivitesinden dolayı thalidomide tercih edilmektedir. Nükseden MM vakalarında

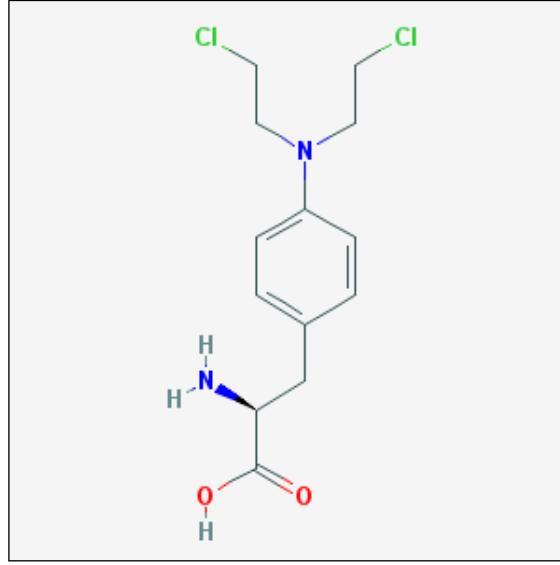
genellikle dexamethasone kullanılmaktadır. Dexamethasone'un melphalan, cyclophosphamide ve thalidomide gibi ilaçlarla kombinasyonunun tedavinin etkinliğini arttırdığı söylenmektedir [Laubach et al., 2011], [Morgan et al., 2012], [Raab et al., 2009].

Uluslararası Kanser Enstitüsü'nün (NCI) tanımına göre; melphalan, antineoplastik aktivite gösteren fenilalanin türevi bir kemoterapi ilacıdır. Melphalanın 2 boyutlu kimyasal yapısı Şekil 5.3' te gösterilmiştir [Web1]. Melphalan DNA'da yer alan bazlardan biri olan guanini N7 pozisyonundan alkilleyerek DNA zincirleri arasına yerleşerek DNA ve RNA sentezini inhibe eder ve hücreler üzerinde sitotoksik bir etki gösterir [Web 2].

Melphalanın vücuttaki yarılanma ömrü 1.3 ile 2.3 saat arasındadır [Taha et al., 1983]. Melphalanın prednisone ile birlikte kullanımı yeni teşhis konulmuş MM hastalarında standart bir terapi uygulamasıdır [San Miguel et al., 2008]. Melphalan kök hücre nakli yapılacak hastalarda nakil öncesi kemoterapik ajan olarak da sıklıkla kullanılmaktadır [Rellick et al., 2012].

Rellick ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, melphalana maruz kalan kemik iliği stroma hücreleri ve osteoblastlarda IL-6 sitokini seviyesinde azalma tespit edilmiştir. MM tümör hücresi sağ kalımında önemli bir eleman olan ve kemik iliği mikroçevresinden salınımı gerçekleşen IL-6 sitokinin eksikliği tümör hücrelerinin çoğalmasına ve hastalığın ilerlemesine engel olan bir faktör olmasından dolayı MM tedavisinde melphalan kullanımının bu yönden de yararlı olabileceği belirtilmiştir [Rellick et al., 2012].

Melphalan ilacının yan etkilerinden biri olarak hastaların kemik iliğinin sağlıklı çalışmaması rapor edilmiştir [Betcher and Burnham, 1990]. Rellick ve arkadaşlarının çalışmasında da, melphalan maruziyeti sonucu oluşan IL-6 eksikliğinin hematopoeze ve kan öncü hücrelerine zarar verebileceği belirtilmiştir [Rellick et al., 2012].



Şekil.5.3: Melphalanın kimyasal yapısı.

6. DEK PROTEİNİ

DEK proteini, 6p22.3 kromozom bölgesinde yerleşmiş olan *DEK* geninin ürünüdür [Riveiro-Falkenbach and Soengas, 2010]. DEK proteini ilk olarak Akut Myeloid Lösemi (AML) hastalarında görülen 6. ve 9. kromozomlar arası translokasyon (t(6;9)) sonucunda NUP214 (CAN) proteini ile füzyon halinde tanımlanmıştır [von Lindern et al., 1992]. İnsanda bulunan DEK proteini 375 aminoasitten oluşur ve 43 kDa boyutunda olup genellikle hücre çekirdeğinde bulunan nüklear bir proteindir [Carro et al., 2006], [Oancea et al., 2010].

DEK proteininin SAP-box ve C-terminal DNA bağlanma bölgesi olarak adlandırılan iki adet DNA'ya bağlanma bölgesi mevcuttur. Bu iki bölge aracılığıyla DNA'ya bağlanan DEK proteini, histon asetil tansferaz enziminin aktivitesini bozarak transkripsiyon baskılayıcı, AP2- α proteininin DNA'ya bağlanmasını sağlayarak ise transkripsiyon indükleyici olarak iki yönlü işleve sahiptir [Logan et al., 2015], [Oancea et al., 2010].

DEK proteini, normal koşullarda büyük oranda hücre çekirdeğinde lokalize olsa da, DNA hasarı, apoptoz ve inflamasyon durumlarında hücre dışı bölgeye salınımı yapılabilmektedir. Hücre dışındaki DEK'in kemo-atraktan fonksiyonlar göstererek immün sistemde görevli bazı hücrelerin inflamasyon bölgesine yönelmesinde rol aldığı bildirilmiştir [Logan et al., 2015], [Saha et al., 2013].

Son zamanlarda, DEK'in HKH'lerin fonksiyonlarına etki edebileceği öne sürülmektedir. DEK'in hematopoetik öncü hücrelerin çoğalmasına negatif bir etki, HKH'lerin ise sağlıklı bir şekilde yaşamlarını sürdürmelerine pozitif etki ettiği belirtilmiştir [Broxmeyer et al., 2013], [Logan et al., 2015].

Ageberg ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, kemik iliğinde bulunan olgunlaşmamış CD34 pozitif (CD34⁺) kan hücresi öncülerindeki *DEK* mRNA oranının, periferik kandaki olgunlaşmış kan hücrelerinden 10 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir. Hücre kültüründe IL-2 aracılığı ile çoğalması tetiklenen hücrelerde de kontrol grubuna oranla 2-3 kat daha fazla *DEK* ifadesi olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlara dayanarak, *DEK*'in olgunlaşmamış hücrelerdeki ifade seviyesinin farklılaşma ve olgunlaşma sürecinde azaldığı ileri sürülmektedir [Ageberg et al., 2006]. Bu görüşe paralel olarak, farklılaşmamış hücrelerde *DEK* ifadesinin hücre farklılaşmasını inhibe ederek hücre transformasyonuna yol açan bir faktör olabileceği iddia edilmektedir [Riveiro-Falkenbach and Soengas, 2010].

Koleva ve ekibinin yürüttüğü diğer bir çalışmada, C/EBP α ve DEK'in birlikteliği ile myeloid gen ifadesini aktive ederek hematopoetik öncü hücrelerin farklılaşma kapasitesini düzenlediği bildirilmiştir. Bu sonuç DEK'in eksikliğinde CD34⁺ öncü hücrelerinin granüositlere farklılaşmasının inhibe edildiği gösterilerek de desteklenmiştir [Koleva et al., 2012].

Retinoblastoma (Rb) proteini tümör baskılayıcı bir proteindir ve bu işlevini bir yolak üzerinde yerine getirir. Bu yolağın en önemli parçalarından biri olan E2F'de oluşan mutasyonlar kanser oluşumunda rol alan en önemli genetik olaylardan biridir. Yapılan bir çalışmada, *DEK* geni ifadesinin E2F transkripsiyon faktörünün kontrolü altında olduğu ve E2F proteinin *DEK* geni promotoruna bağlanarak DEK proteini ifadesini arttırdığı gösterilmiştir. Bu sonuç doğrultusunda DEK ifadesinin E2F tarafından düzenlenmesinin birçok kanser türünde fazla DEK ifadesi görülmesine açıklama sağladığı ileri sürülmüştür [Carro et al., 2006].

DEK proteininin hepatoselüler karsinom, glioblastom, melanom, mesane kanseri, retinoblastom, göğüs kanseri, kolon kanseri ve larinks kanseri gibi birçok kanser türünde aşırı ifade edildiği bildirilmiştir [Carro et al., 2006], [Saha et al., 2013]. Yüksek seviyede DEK ifadesinin tümör oluşumu önündeki apoptoz ve senesens gibi engelleri kaldırdığı ve tümörlü hücrelerin yaşamasına katkı sağladığı düşünülmektedir [Riveiro-Falkenbach and Soengas, 2010], [Saha et al., 2013].

7. MATERYAL ve YÖNTEM

7.1. Materyal

Tablo 7.1: Hücre hatları.

Hücre Hattı	Katalog Numarası	Firma
U266 Multipl Miyelom	TIB-196	ATCC
293 T İnsan embriyonik		Dr. Gerard Grosveld

Tablo 7.2: Plazmitler.

Ürün	Katalog Numarası	Firma
pGFP-C-shLenti-shDEK p.	TL313507	Origene
Paketleme plazmitleri		Dr. Gerard Grosveld

Tablo 7.3: Primer Problar.

Ürün	Katalog Numarası	Firma
DEK, human	HS00180127-M1	Applied Biosystems
ACTB, human	HS01060665-G1	Applied Biosystems

Tablo 7.4: Antikorlar.

Ürün	Katalog Numarası	Firma
Fare anti-insan DEK antikor	610948	BD
HRP-konjuge anti-fare	7076S	Cell Signaling
Tavşan anti-insan GAPDH	5174P	Cell Signaling
HRP-konjuge anti-tavşan	7074P2	Cell Signaling

Tablo 7.5: Kitler, Kimyasallar.

Ürün	Katalog Numarası	Firma
RPMI Medium	22400-089, Gibco	Life Technologies
RPMI Medium	SH30027.01	Hyclone
DMSO	BP231-1	Fisher Scientific
FBS	26140-111, Gibco	Life Technologies
2-Propanol	24137-2.5L-R	Sigma-Aldrich
Polybrene	H-9268	Sigma-Aldrich
Kloroform	24216-2.5L-R	Sigma-Aldrich
PBS	14190094	Gibco
DMEM	41966029	Gibco
Penicilin/Streptomycin	151401	Gibco
Pierce BCA Pro.Ass.Kit.	23227	Thermo Scientific
Transfeksiyon Kiti	E1200	Promega
Sodyum Chloride	S7653-250G	Sigma-Aldrich
Sodium Phosphate Di.	S7907-100G	Sigma-Aldrich
HEPES	H4034-25G	Sigma-Aldrich
Calcium Chloride Dihyd.	C7902-500G	Sigma-Aldrich
Sodium deoxycholate	D6750-10G	Sigma-Aldrich
Trizma Base Reagent	T1503-1KG	Sigma-Aldrich
SDS	L3771-100G	Sigma-Aldrich
NaCl	S7653-250G	Sigma-Aldrich
BSA	A2153-10G	Sigma-Aldrich
NP-40	A1694,0250	Appllichem
Formaldehit (%37)	TK.060162.05000	Teknokim
EDTA	BP118-500	Fisher Chemical
7AAD	420403	Biologend
Beta-mercaptoethanol	A1108.0100	Appllichem
Nükleaz içermeyen su	AM9932, Ambion	Life Technologies
High capacity cDNA Reverse	4368814	Applied Biosystems
2X Taqman Universal Master	4324018	Applied Biosystems
Ecomount Kapatma Maddesi	EM897L	Biocare
Absolut Etanol	32221	Sigma
Ksilol	16446	Sigma
Tryphan Blue	T10282	Invitrogen
Tripure Isolation Reagent	11667157001	Roche
Yürütme Tamponu	161-0732	Biorad
Yükleme Tamponu	161-0747	Biorad
Marker	26616	Thermo Scientific
TBS	TBS999	ScyTek Laboratories
Tween	P9416-50ML	Sigma Aldrich
Kemiluminisan	32132	Thermo Scientific
Melphalan	M2011-100MG	Sigma Aldrich
Metanol (%99.9)	34885-2.5L-R	Sigma Aldrich
Proteaz/Fosfataz	2551G	Ambion

Tablo 7.6: Cam, Plastik ve Sarf Malzemeler.

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

Tablo 7.7: Cihazlar.

Ürün	Katalog Numarası	Firma
CO ₂ İnkübatör	HF90	Heal Force
qPCR makinesi	Stratagene	Agilent Technologies
PCR makinesi	MJ-Mini PTC1148	Bio-Rad
Nanodrop	206-26300-48	Shimadzu Biotech
Cytospin	CY9064	Thermo Scientific
Etüv	466-3510	VWR
Çalkalayıcı	S2025-B-230V	Labnet International
Multi rötor	Multi RS-60	Biosan
FACS Jazz	655487	BD
Transblot Tranfer Sistemi		Biorad
Varioskan	3001-1571	Thermo Scientific
Floresan mikroskobu	Eclipse Ti-S	Nikon
Chemi Doc XRS+	721BR04545	Biorad
Sıvı azot tankı	LS4800	Taylor Wharton
Ters mikroskop	Eclipse TS100	Nikon
Su banyosu	0400702135J036	Wisd Lab. Ins.
Worteks	444-1372	VWR International
Sentrifüj	1-14	Sigma
Ters Florasan mikroskobu	Eclipse 80i	Nikon
Işık mikroskobu	Eclipse, E100	Nikon
Micro pipet	F167300	Gilson
Isıtıcı blok	BSH1002-E	Benchmark

7.2. Yöntem

7.2.1. Hücre Kültürü ve Hücrelerin Dondurularak Saklanması

Sıvı azot tankından alındıktan sonra 37°C'deki su banyosunda çözülen ve 20 ml medyum ile 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek yıkanan hücreler, 25cm²'lik alanda (T-25 flask) 5 ml glutamin ilave edilmiş RPMI 1640 medyumunda (%15 FBS, %1 penisilin/streptomycin) $\sim 2 \times 10^6$ canlı hücre olmak üzere, 37°C %5 CO₂ ortamında inkübe edildi. Hücre hatları her üç günde bir pasajlanarak hücre kültürünün devam etmesi sağlandı.

Hücreler dondurulmak istenildiğinde gerekli miktarda hücre alınıp (1ml'lik "cryo" tüpler için $\sim 6 \times 10^6$ canlı hücre) 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve pellete 1ml %10 DMSO içeren FBS eklendi. Elde edilen hücre ve medyum karışımı "cryo" tüpe aktarıldı ve içinde isopropanol bulunan kap ile -80° C'de bir gün bekletildikten sonra "cryo" tüpler, hücreleri uzun süre muhafaza etmek için sıvı azot tankına aktarıldı.

7.2.2. Lentivirüs Üretilmesi ve Transdüksiyon

7.2.2.1. Transfeksiyon

Transfeksiyon işlemi için kalsiyum-fosfat yöntemi kullanıldı. 293T hücre hattı, %10 FBS+glutamin+pen/strep içeren DMEM medyumunu kullanılarak kültür ortamında (37°C / %10 CO₂) çoğaltıldı. Hücreler transfeksiyondan bir gün önce 10 cm'lik petrilere %10 oranında inaktive edilmiş FBS (55°'de 1 saat) ve %1 oranında glutamin+pen/strep.'in DMEM ile karıştırılmasıyla hazırlanmış virüs hazırlama medyumunu içinde 4×10^6 hücre / 9ml olacak şekilde ekildi. Plazmit transfeksiyonu (10 µg lentiviral plazmit (sh-RNA plazmiti) ve 6 µg GPI-R, 2µg RTR-2, 2µg VSV-G paketleme plazmitleri) promega kalsiyum fosfat transfeksiyon kit'inin (E1200, Promega) önerdiği metod kullanılarak uygulandı. Transfeksiyondan 18 saat sonra petrilereki medyum vakum ile çekildi. Her petri 5ml PBS ile iki defa yıkandı ve her bir petriye 5ml taze virüs hazırlama medyumunu eklenerek hücreler 24 saat süreyle 37°C / %10 CO₂ 'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda transfeksiyonun çalışıp

çalışmadığı ters floresan mikroskop ile teyit edildi (GFP pozitif hücreler transfeksiyonu gerçekleştirmiş hücreler olarak kabul edildi). Transfeksiyondan 48 saat sonra virüs içeren medyum petrilere toplanıp 0,45µm'lik filtreden geçirildikten sonra hedef hücrelerin infekte edilmesi (transdüksiyon) için kullanıldı.

7.2.2.2. Transdüksiyon

Transdüksiyon öncesinde 5×10^6 U266 hücre hattı 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve pellete 8 ml hücre büyüme medyumunu (RPMI 1640), 16µl polybrene (1µg/ µl) ve 8ml de virüs eklendi. U266 hücreleri ve virüs karışımı her flaskta 5,3 ml olacak şekilde 3 adet 'T-25' flaskta transfer edildi (her bir flaskta $\sim 1,6 \times 10^6$ hücre). Ertesi gün PBS ile yıkanan hücrelere taze büyüme medyumunu eklenerek hücrelerin kültürde devamlılığı sağlandı.

7.2.3. Transdükte Olmuş Hücrelerin FACS ile Ayırıştırılması

Transdüksiyon sonrasında GFP sentezleyen ve GFP sentezlemeyen hücreler akım sitometrisi (FACS) kullanılarak ayırıştırıldı. Hücrelerin birbirinden ayırıştırılması işleminde her bir hücre grubundan yaklaşık 10×10^6 hücre santrifüj edildi ve üzerine %2 BSA ve 4mM EDTA içeren 10 ml PBS (ayırıştırma solüsyonu) eklendikten sonra 40µm'lik filtreden (352340, BD) geçirildi. GFP pozitif hücrelerin FACS sonrasında -20°C ' de dondurulmuş %50 FBS içeren 1 ml RPMI 1640 medyum içeren falkonda toplandı.. Toplanan hücrelerin yaklaşık %10' u alınarak GFP pozitif hücre saflığı FACS ile tespit edildi. Geri kalan hücreler 1000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi ve pellete büyüme medyumunu eklenerek hücrelerin kültürde devamlılığı sağlandı.

7.2.4. RT-qPCR

7.2.4.1. Total RNA İzolasyonu

İnfekte olmamış (U266) ve FACS ile izole edilmiş (GFP pozitif olan) sh negatif (sh-neg), shDEK-B , shDEK-C hücrelerinden yaklaşık $1,5 \times 10^6$ canlı hücre 1000 rpm'de 10 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası hücreler 5ml soğuk PBS ile yıkandı ve pelletin üzerine 1 ml 'Trizol' eklenip karıştırıldıktan sonra hücrelere 0,2 ml kloroform eklendi ve yaklaşık 3 dakika oda ısısında bekletildi. Bu örnekler 14000 rpm'de 15 dakika +4 °C' de santrifüj edildikten sonra 3 katmanlı bir solüsyon elde edildi. Bu 3 katmanın en üstünde yer alan aqueuous katman pipet yardımıyla alınarak yeni ependorflara aktarıldı. Örneklerinin üzerine 0,5 ml %100'lük isopropanol eklendi ve 10 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 14000 rpm'de 10 dakika +4 °C' de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında pellet 2 kez %75'lik etanol ile yıkanarak, +4 °C' de 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Kuruması sağlanan pellet üzerine 30 µl RNase-free su eklendi ve 'nanodrop' cihazı ile konsantrasyon ölçümü yapıldı.

7.2.4.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için kitle (4368815, Applied Biosystems) gelen metod kullanıldı. Kısaca, her örnek için 2µl RT buffer, 2µl random primer, 0.8µl dNTP mix, 1µl Reverse Transkriptaz, 1µl RNase inhibitör ve 3,2 µl nükleazsız H₂O kullanılarak 10µl hacimde master mix hazırlandı. Bu mix ile, 200ng/10µl konsantrasyona sahip RNA örnekleri karıştırılarak elde edilen 20µl'lik karışımda cDNA sentezi yapıldı (25°C' de 10 dakika, 37°C'de 120 dakika ve 85°C'de 5 dakika). Sentezlenen cDNA örnekleri -20°C'de saklandı.

7.2.4.3. qPCR

DEK mRNA ifadesinin seviyesini belirlemek amacıyla RT-qPCR yöntemi kullanıldı. Her örnek için 10µl 2XTaqman Master Mix, 7µl NF-H₂O, 1µl primer/probe karışımı ve 2µl cDNA kullanıldı. Örnekler 3'er tekrar olacak şekilde

hazırlandı ve qPCR cihazında 1 döngü olacak şekilde 50°C’de 2 dakika ve 95°C’de 10 dakika inkübasyon ve ardından 40 döngü olacak şekilde 95°C’de 15 sn, 60°C’de 1 dakika olacak şekilde qPCR reaksiyonu gerçekleştirildi. RT-qPCR reaksiyonu sonucu *DEK* ve *ACTB* (referans gen olarak kullanıldı) genleri için ayrı elde edilen “Ct (threshold cycle)” değerlerinin aritmetik ortalaması alındı ve her bir örnekteki *DEK* Ct değerinden aynı örneğin *ACTB* Ct değeri çıkarılarak (*DEK-ACTB*) Δ Ct değeri hesaplandı. Ardından her bir örneğin Δ Ct değerinden, kalibratör olarak belirlenen kontrol örneğinin (infekte olmamış U266) Δ Ct değeri çıkarılarak $\Delta\Delta$ Ct değeri hesaplandı. $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ formülü kullanılarak *DEK* gen ifadesi kalibratöre göre göreceli olarak belirlendi.

7.2.5. Western Blot Yöntemi ile Protein Analizi

7.2.5.1. Protein İzolasyonu

Yaklaşık 3×10^6 canlı hücre 1000 rpm’de 10 dakika +4° C’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında hücreler 6ml soğuk PBS ile yıkandı (1500 rpm’de 10 dakika +4° C’de santrifüj). Pellete 99µl RIPA buffer ve 1µl proteaz/fosfataz inhibitörü eklenerek örnekler 30 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Ardından 15 sn sonikasyon, 20 sn bekleme ve yeniden 15 sn sonikasyon uygulandı. Örnekler son olarak 13000 rpm’de 10 dakika +4° C’de santrifüj edildikten sonra süpernatant (üst sıvı) yeni ependorflara aktarıldı ve Western blot deneylerinde kullanıldı.

7.2.5.2. Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein miktarı Pierce BCA Protein Assay Kiti ve firma tarafından tavsiye edilen metod kullanılarak tespit edildi. Kısaca; her bir kuyuya (96 kuyulu plaka) 50:1 oranında karıştırılan A ve B çözeltilerinden (200µl) ve konsantrasyonunu bildiğimiz standartlardan veya örneklerden 25µl eklendi. Alüminyum folyo ile üzeri kaplanan plaka, çalkalayıcı üzerinde 30 sn inkübe edildi ve 562 nm’lik absorbans değerinde ölçüm alınarak protein miktarları belirlendi.

7.2.5.3. SDS Jel Elektroforezi

Protein Jel Elektroforezi için %10'luk mini protean hazır jel (456-9033, Biorad) kullanıldı. Jel dikey elektroforez sistemine yerleştirilerek 1X yürütme tamponu (10X hazır tampon (161-0732, Biorad) 1/10 oranında sulandırıldı) ile yeterli miktarda dolduruldu. Örneklerin her birinden 30µg alınıp 4X LB (%10 beta merkaptotanol içeren) ile karıştırıldı ve dH₂O ile 20µl ye tamamlandı. Hazırlanan örnekler 95° C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra marker ile birlikte jele yüklendi ve 80 V'de, yaklaşık 2 saat yürütüldü.

7.2.5.4. Proteinlerin Jelden Membrana Transferi

Proteinleri jelden membrana transfer etmek için hazır nitrosetülöz membran (170-4159, Biorad) kullanıldı ve transblot cihazında (170-4155, Biorad) 100 V'de 7 dakika süreyle (the MIXED MW programı) transfer gerçekleştirildi.

7.2.5.5. Antikor Uygulaması

Transfer sonrası membran 1-2 dakika kadar yaklaşık 10ml 1000/1 oranında Tween (P9416-50ML, Sigma Aldrich) içeren TBS (TBS999, ScyTek Lab.) solüsyonu (TBS-T) ile yıkandı ve TBS-T ile hazırlanan %5'lik BSA (A2153-10G, Sigma Aldrich) çözeltisinde 1 saat inkübe edildi. Ardından 2:1000 oranında %5'lik BSA solüsyonu ile sulandırılan primer antikordan (Mouse anti-human DEK, 610948, BD) (50 ml'lik falkonda 5ml olacak şekilde) eklendi ve gece boyu +4° C'de rotorda inkübasyona bırakıldı. Membran oda ısısında 4 kez TBS-T solüsyonu ile 10'ar dakika yıkandı ve 3:10000 oranında %5'lik BSA ile sulandırılan sekonder antikordan (HRP-konjuge anti-fare, 7076S, Cell Signaling) 5ml eklenip, oda ısısında 1 saat inkübe edildi. Tekrar 4 kez 10'ar dakika TBS-T solüsyonu ile yıkanan membran kemiluminisan görüntüleme için hazır hale getirildi. Proteinlerin jele yüklenme oranını tespit etmek amacıyla, aynı membran, 1:2000 oranda sulandırılmış GAPDH primer antikor (Tavşan anti-insan GAPDH, 5174P, Cell Signaling) ve ardından 1:3000 oranda sulandırılmış sekonder antikor (HRP-konjuge anti-tavşan, 7074P2, Cell Signaling) ile inkübe edilerek görüntülendi.

7.2.5.6. Görüntüleme

Kemiluminisan görüntüleme için kullanılmak üzere 1ml zenginleştirilmiş kemiluminisan solüsyonu (32132, Thermo Scientific) hazırlandı ve membran görüntüleme cihazına (Chemi Doc XRS+, 721BR04545, Biorad) yerleştirildikten sonra solüsyon membran üzerine bütün alanı kaplayacak şekilde damla damla dağıtıldı ve Image Lab. 4.0.1 programı kullanılarak görüntü alındı.

7.2.6. Proliferasyon Analizi

7.2.6.1. Trypan Mavisi ile Hücre Sayısı ve Canlılığının Tespiti

Ölü ve canlı hücreleri birbirinden ayırt etmek için hücreler ‘trypanblue’ boyası ile boyandı. Bu yöntemle, canlı hücrelerde hücre zarı sağlam olduğundan boyanma gözlenmemektedir, ancak ölü hücreler hücre zarlarının seçici geçirgen özelliğinin kaybolmasından dolayı koyu mavi renkte boyanmakta ve mikroskopta canlı hücreler boyasız parlak, ölü hücrelerse mavi ve mat olarak görünmektedir. “Trypan blue” ve “Thoma” lamı kullanılarak sayılan hücrelerin canlılık oranını tespit etmek için: $(\text{canlı hücre sayısı} / \text{toplam hücre sayısı}) \times 100$ formülü uygulandı (Toplam hücre sayısı = canlı hücre sayısı + ölü hücre sayısı).

7.2.6.2. FACS ile Ayrıştırılmamış Hücrelerde Periyodik GFP Analizi

Periyodik GFP analizi, ilk analiz virüsle infeksiyondan 3 gün sonra olacak şekilde, ‘FACSJazz’ cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla, 1×10^6 hücre 1000 rpm’de 10 dakika 22 °C’de santrifüj edildi ve pellete 100µl PBS ve 5µl 7AAD (420403, Biolegend) (50µg/ml) boyası ilave edilip 20 dakika buz üzerinde inkübe edildikten sonra üzerine 1 ml soğuk PBS eklenerek filtreden geçirilip hücrelerdeki GFP oranı analiz edildi. Deney her üç günde bir tekrarlanarak (toplam 25 gün boyunca) infekte edilmiş hücrelerdeki GFP pozitif hücre oranı periyodik olarak izlendi.

7.2.6.3. FACS ile Ayırıştırılmış GFP^{pozitif} Hücrelerde Proliferasyon Analizi

6 kuyulu plakalara 2'şer tekrar olmak üzere (toplam 5 ayrı gün için) 2×10^5 hücre/ml (her kuyucuğa toplam 3ml) yoğunluk elde edilecek şekilde hücre ekildi (bu aşamada hücreler sayılarak 0.gün verileri alındı). Her 24 saatte bir, o gün için ekilmiş olan kuyulardan hücreler alınıp sayılarak, toplam ve canlı hücre sayıları için iki tekrarın aritmetik ortalaması, hesaplandı. Her gün için elde edilen veriler büyüme eğrisi ve hücre bölünme zamanının (doubling time) tespit edilmesi için kullanıldı [Web 3].

7.2.7. Kemoterapi (Melphalan) İlacına Direncin Analizi

Hücreler 4×10^5 hücre/ml yoğunluk elde edilecek şekilde sulandırıldı. Ayrı olarak hazırlanan $20 \mu\text{M}$ Melphalan (M2011-100MG, Sigma Aldrich) içeren besiyeri 1:1 oranında hücrelerle karıştırıldı (2×10^5 hücre/ml; $10 \mu\text{M}$ Melphalan). Ardından hücreler proliferasyon analizi deneyine benzer şekilde sayılarak büyüme eğrileri belirlendi.

7.2.8. Giemsa Boyama

“Giemsa boyama” yöntemi ile hücre morfolojisi analizi yapıldı. Boyama için; $100 \mu\text{l}$ (20000-50000) hücre ‘cytospin’ cihazında 1000 rpm’de 5 dakika çevrilerek lama yapıştırıldı. Hücrelerin görüntüsüne mikroskopta bakılıp lamdaki yoğunluğun uygun olduğuna karar verildikten sonra hücreler %100 metanolde 10 dakika fikse edildi. Fiksasyon sonrasında 10 dakika kurutulan lamlar ‘Giemsa’ solüsyonunda (2,5 ml giemsa ve 47,5 ml tampon kullanılarak hazırlandı) 17 dakika inkübe edildi. Boya su ile durulandıktan sonra lamlar hızlıca %100 etanolden geçirilip, ksilole alındı ve 2 kez yaklaşık 2 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası lamlar kurutuldu ve kapama solüsyonu (EM897L, Biocare) kullanılarak lamelle kapatıldı. Örnekler ışık mikroskopunda (Eclipse, E100, Nikon) incelenerek fotoğraflandı.

7.2.9. İstatistiksel Analiz

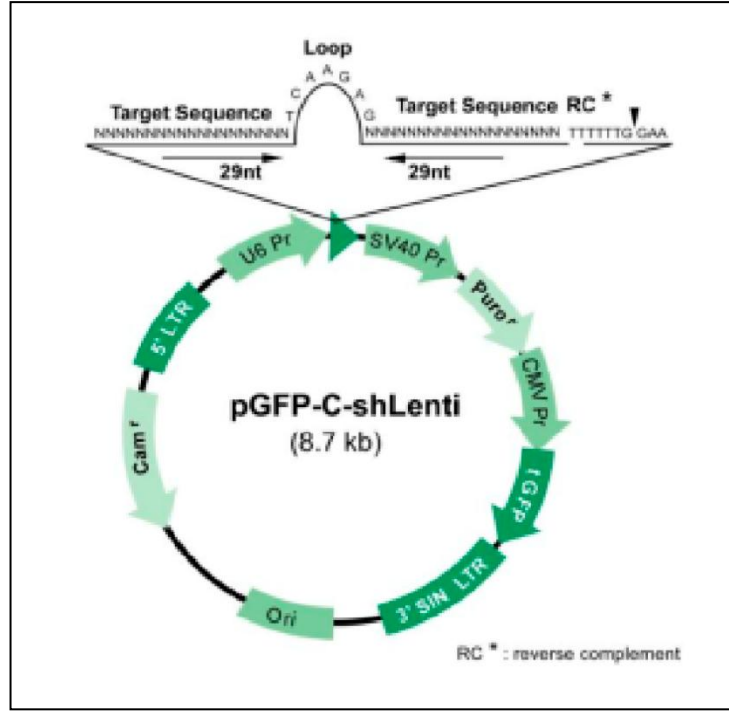
Bütün deneylerden elde edilen sonuçların istatistik analizleri GraphPad Prism 6.01 programı kullanılarak yapıldı.

8. BULGULAR

8.1. U266 Hücrelerinde Kalıcı Olarak DEK İfadesinin Susturulması

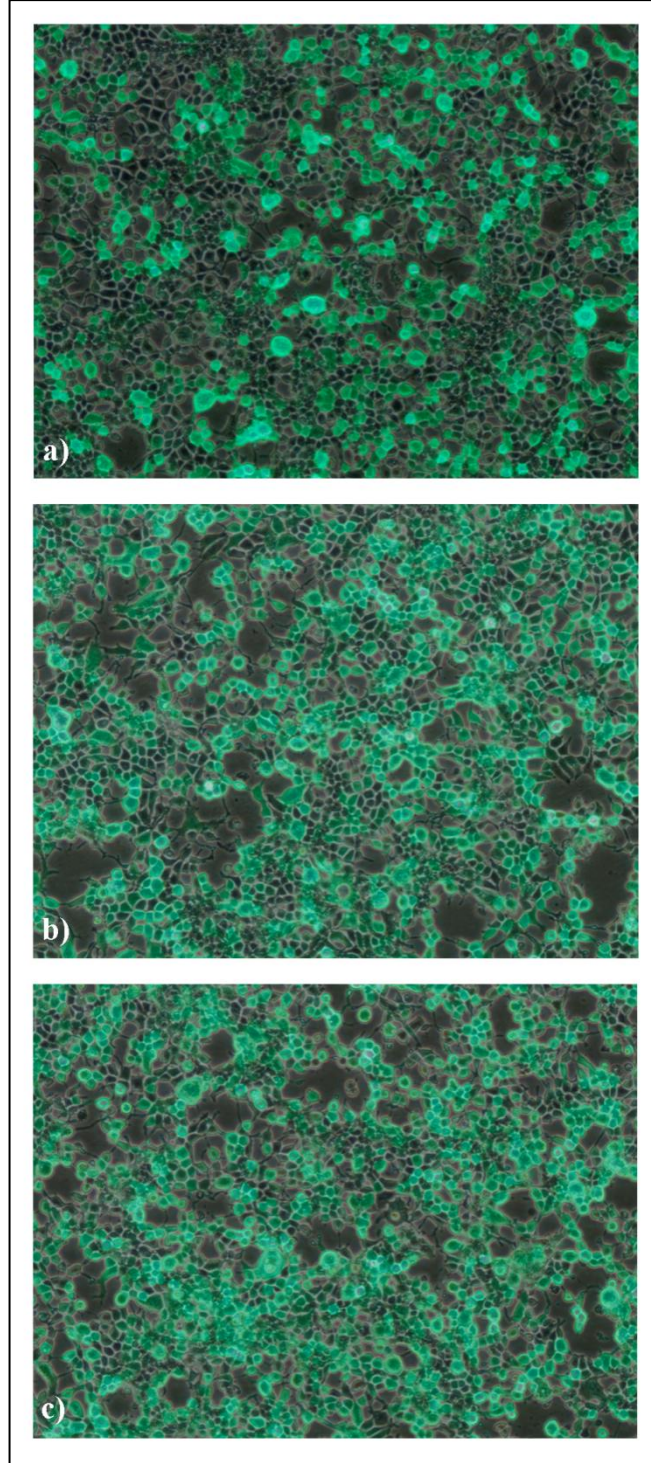
Çalışmamızda, DEK ifadesinin kalıcı olarak baskılanmasının MM hücre biyolojisine olan etkilerini incelemek amacıyla, literatürde sıklıkla kullanılan U266 MM hücre hattı ve *DEK* mRNA'sına özgün short hairpin RNA'ları (shRNA) sentezleyen ve Origene firmasından satın alınan lentiviral vektörler kullanıldı. Lentiviral transdüksiyon yöntemi, yabancıl tip lentivirüslerin yaşamsal özelliklerinden biri olan kendi genomunu konak hücre genomuna aktarma özelliğinden faydalanılarak istenilen genom parçasını, hedef hücreye aktarma temeli üzerine kurulmuştur. Lentivirüslerin genom özelliklerinden faydalanarak shRNA'ların hedef hücrenin genomuna aktarılması ile kalıcı gen baskılanması sağlanmış olur [Moore et al., 2010].

DEK ifadesini baskılamak amacıyla, *DEK* mRNA'sının 29 bazlık kısımlarına özgün dizi içeren 4 ayrı lentiviral shRNA vektörü (Origene, TL313507) daha önce laboratuvarımızda test edildi ve etkinliği en yüksek olan shDEK-B ve shDEK-C lentiviral vektörleri bu çalışmada kullanıldı. Negatif kontrol olarak, hücrede etkin olmadığı firma tarafından test edilmiş olan "scrambled shRNA" içeren pGFP-C-shLenti vektörü (sh-neg.) çalışmaya dahil edildi. Çalışmamızda kullanılan pGFP-C-shLenti vektörleri, yapısında bulunan U6 promoter'ı kontrolünde shRNA moleküllerini, CMV promoter'ı kontrolünde ise transdükte ya da transfekte olmuş hücrelerin ayırt edilmesini sağlayan "green fluorescent protein (GFP)" sentezlemektedirler Şekil 8.1 [Web 4].



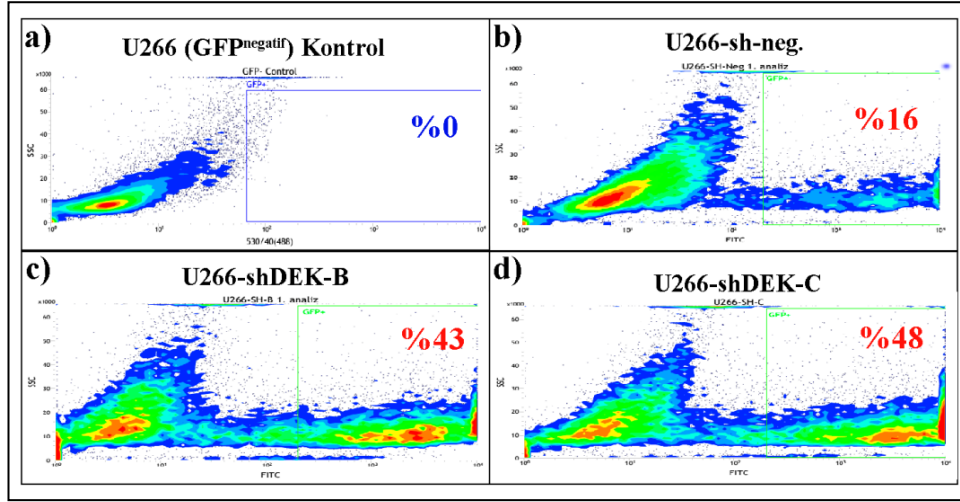
Şekil 8.1: *DEK*'e özgün shRNA taşıyan vektörlerin genel yapısı.

293T hücre hattının virüslerin oluşabilmesi için gerekli olan yapısal genleri taşıyan plazmitler ve shRNA (shNeg, shDEK-B ve shDEK-C) plazmitleriyle transfekte edilmesiyle lentivirüsler elde edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra ters floresan mikroskopta yapılan incelemelerde, 293T hücrelerinin transfeksiyon oranının her üç örnekte de yüksek düzeyde olduğu tespit edildi Şekil 8.2.



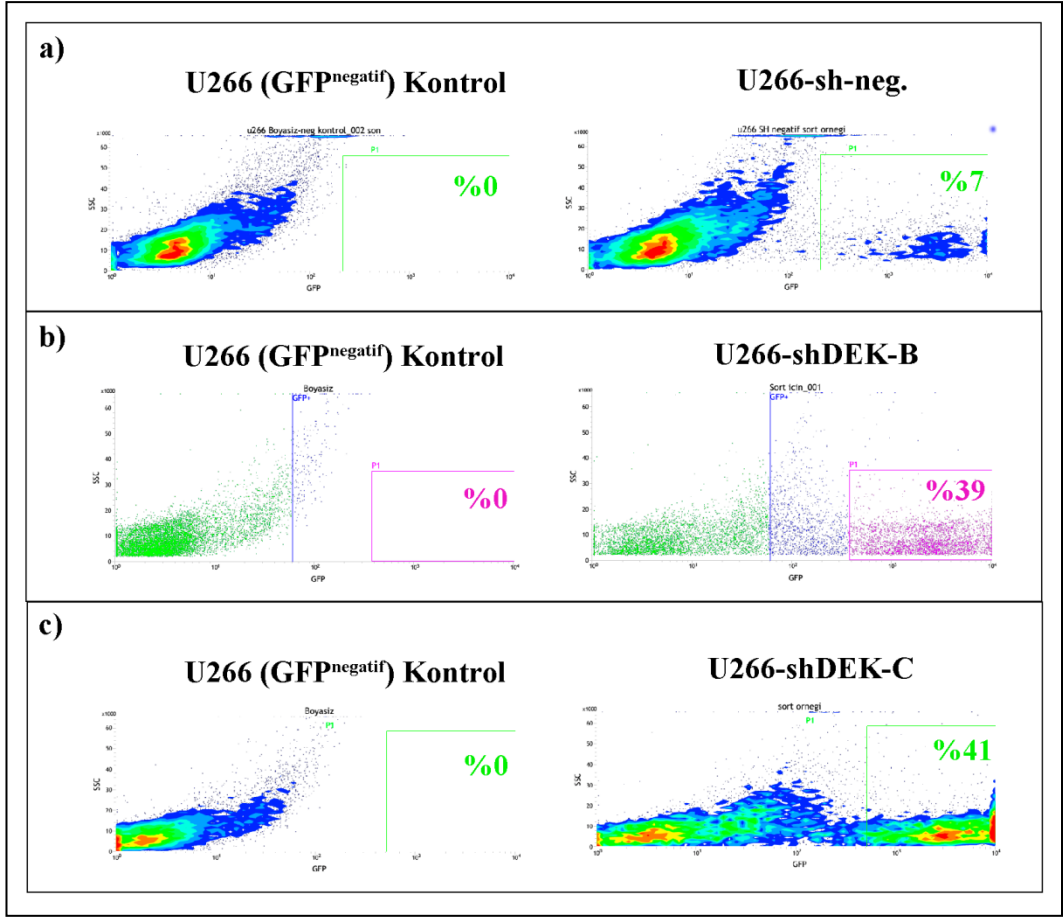
Şekil 8.2: 293T hücrelerinin lentiviral vektörlerle transfeksiyonu. a) sh-neg., b) shDEK-B, ve c) shDEK-C lentiviral vektörleri ile transfekte edilmiş hücrelerin transfeksiyondan 24 saat sonraki ters floresan mikroskop görüntüleri.

293T hücrelerinden toplanan virüslerle infekte edilen U266 hücrelerinin infeksiyondan 72 saat sonra yapılan ilk akım sitometrisi (Fluorescence-activated cell sorting (FACS)) analizi sonucunda, sh-neg., shDEK-B ve shDEK-C hücrelerinde GFP^{pozitif} hücre oranlarının yaklaşık %16, %43 ve %48 olduğu belirlendi Şekil 8.3.

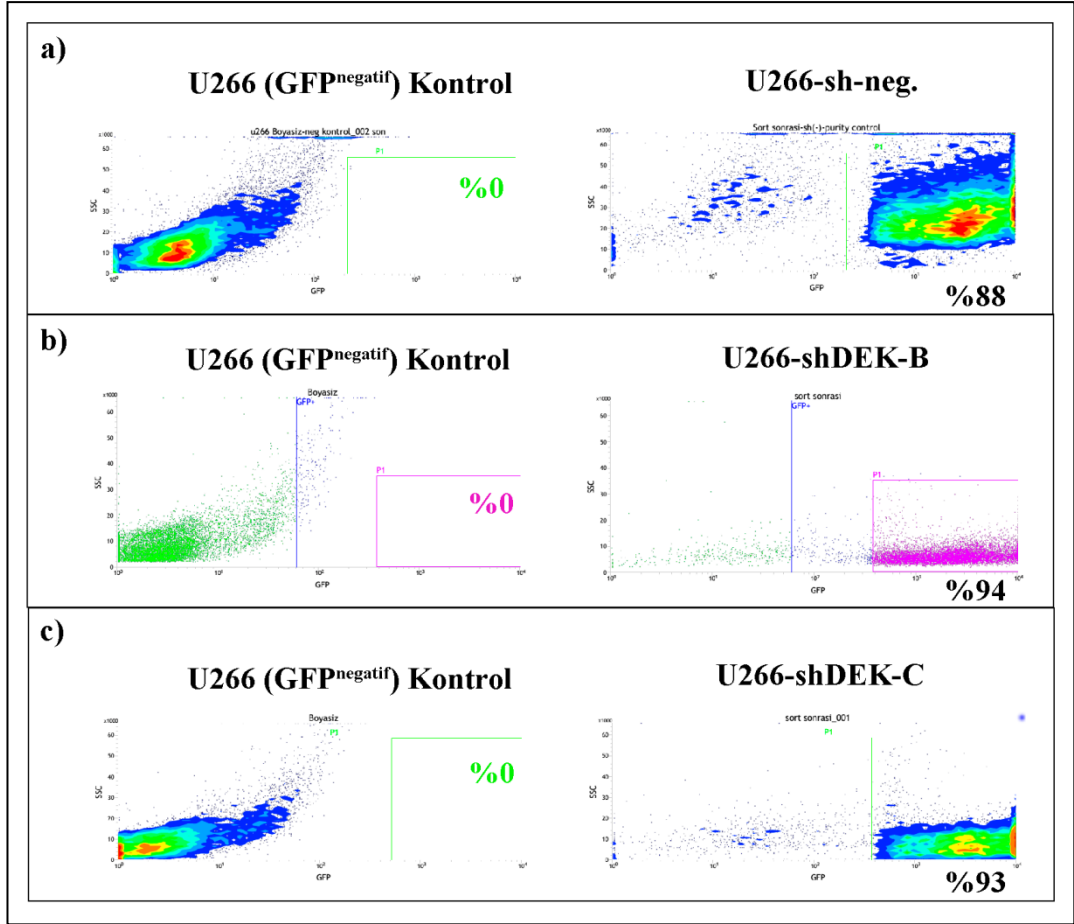


Şekil 8.3: U266 hücrelerinin transdüksiyondan 72 saat sonra FACS ile GFP analizi. a) U266 (GFP^{negatif}) kontrol hücreleri b) sh-neg., c) shDEK-B, ve d) shDEK-C lentivirüsü ile infekte olmuş hücreler.

İlk GFP analizinin ardından hücreler kültür ortamında yeterli sayıya ulaşana kadar çoğaltıldı ve DEK ifadesinin baskılanma oranını tespit etmek amacıyla, bu hücre hatlarındaki GFP^{pozitif} hücreler aynı kültürde bulunan GFP^{negatif} hücrelerden FACS ile ayrıştırıldı Şekil 8.4. Ayrıştırma işleminin hemen sonrasında, GFP^{pozitif} hücrelerin saflığını test etmek için yapılan FACS analiziyle 3 hücre grubunda da ayrıştırma işleminin etkinliğinin yaklaşık % 90 olduğu belirlendi Şekil 8.5.

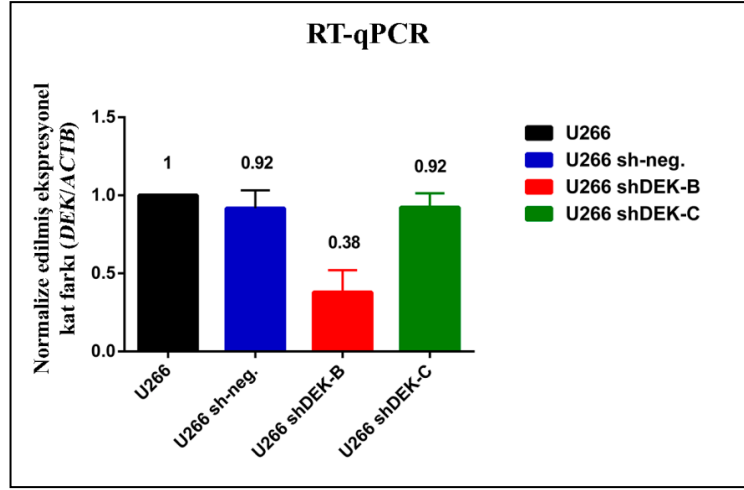


Şekil 8.4: Transdüksiyon sonrası GFP^{pozitif} hücrelerinin ayrıştırılmasında kullanılan “gate”ler. a) Kontrol ve sh-neg. hücreleri, b) Kontrol ve shDEK-B hücreleri, c) Kontrol ve shDEK-C hücreleri.



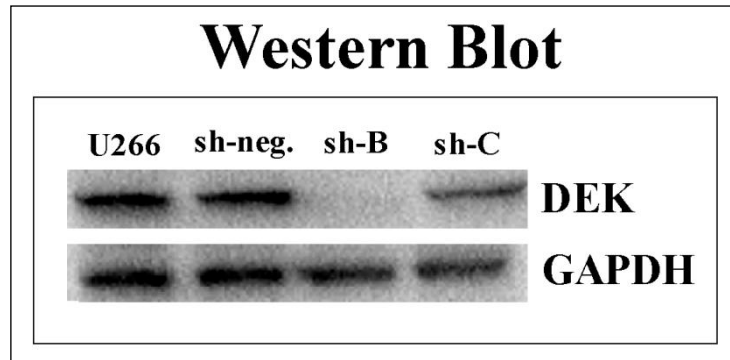
Şekil 8.5: GFP^{pozitif} hücrelerin FACS ile ayırıştırma sonrasında saflığının kontrol edilmesi. a) Kontrol ve GFP^{pozitif} sh-neg. hücreleri, b) Kontrol ve GFP^{pozitif} shDEK-B hücreleri, c) Kontrol ve GFP^{pozitif} shDEK-C hücreleri.

FACS ile ayırıştırılmış olan sh-neg., shDEK-B ve shDEK-C hücrelerinden elde edilen total RNA örneklerinin RT-qPCR analizleri sonucunda *DEK* ifadesinin shDEK-B hücrelerinde negatif kontrole göre yaklaşık %60 oranında azaldığı, ancak shDEK-C hücrelerinde *DEK* mRNA seviyesinde bir değişiklik olmadığı gözlemlendi Şekil 8.6.



Şekil 8.6: GFP^{pozitif} U266 hücrelerinde *DEK* mRNA seviyesinin RT-qPCR ile belirlenmesi. Grafik 3 ayrı deney sonucunun ortalamasını göstermektedir.

Literatürde, shRNA kullanılan gen baskılanması yöntemlerinde bazı durumlarda shRNA'ların microRNA'lar (miRNA) gibi fonksiyon göstererek mRNA degradasyonu olmadan protein düzeyinde gen ifadesini baskıladığı bildirilmiştir [Doench et al., 2003]. Bu verilere uyumlu olarak, yapılan Western blot analizi sonucunda, gerek shDEK-B hücrelerinde gerekse *DEK* mRNA seviyesinde değişiklik tespit edilmeyen shDEK-C hücrelerinde *DEK* protein miktarının baskılandığı tespit edildi Şekil 8.7.

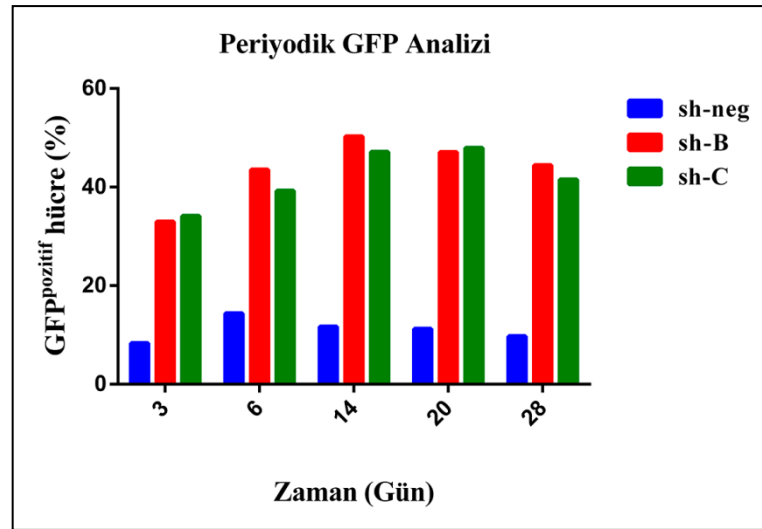


Şekil 8.7: Western blot yöntemi ile GFP^{pozitif} sh-neg, shDEK-B ve shDEK-C hücrelerinde *DEK* protein miktarının belirlenmesi. GAPDH antikoru “loading control” olarak kullanıldı.

Tüm bu deneyler sonucunda, *DEK* protein ifadesi farklı oranlarda kalıcı olarak baskılanmış ve FACS ile ayrıştırılmış (GFP^{pozitif}) iki hücre hattı (U266-shDEK-B ve U266-shDEK-C) ve kontrol U266-sh-neg hücre hatları elde edildi.

8.2. DEK Geni Susturulan Hücrelerin Büyüme Eğrilerinin ve Bölünme Sürelerinin Belirlenmesi

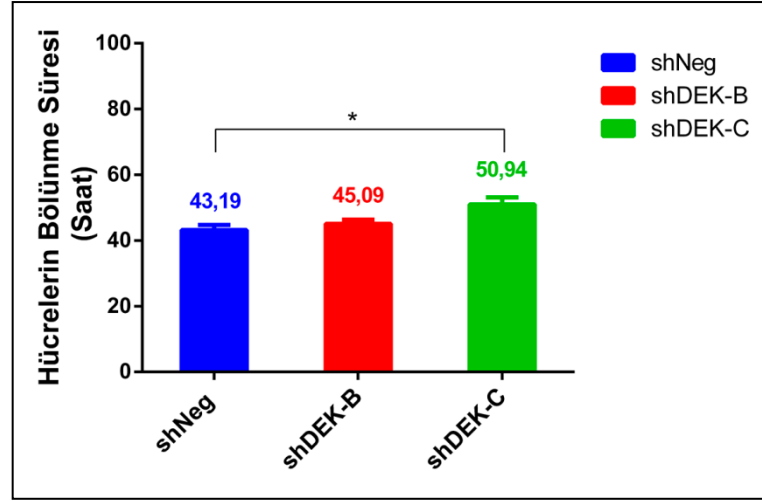
DEK ifadesi baskılanmış olan hücrelerin normal U266 hücrelerine karşı çoğalma avantajı kazanıp kazanmadıklarını test etmek amacıyla, FACS ile ayrıştırılmamış olan GFP^{pozitif} shDEK-B ve shDEK-C hücreleri, aynı kültürde bulunan GFP^{negatif} hücrelerle birlikte kültür edildi (bu süre içinde, üç günde bir olacak şekilde hücreler benzer konsantrasyonda seyreltilip yeniden ekilerek kültür edildi) ve periyodik olarak her bir kültürdeki GFP^{pozitif} hücre yüzdesi FACS ile belirlendi. FACS analizi, her üç hücre hattında da GFP^{pozitif} hücre oranının benzer şekilde korunduğunu, dolayısıyla DEK ifadesinin azalmasının hücrelerin çoğalmasında çok belirgin bir artış ya da azalmaya yol açmadığını gösterdi Şekil 8.8.



Şekil 8.8 : Lentiviral infeksiyondan sonra, FACS ile ayrıştırılmamış U266 hücrelerine 3, 6, 14, 20 ve 28. günlerde uygulanan periyodik GFP analizi sonuçları. Grafikte her kültürdeki GFP^{pozitif} hücre oranı gösterilmektedir.

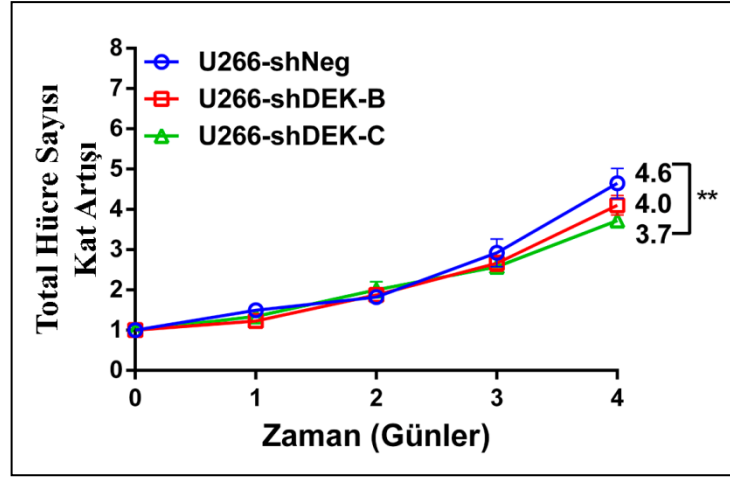
Ayrıca, sh-RNA eksprese eden U266 hücreleri FACS ile ayrıştırıldıktan sonra, GFP^{pozitif} olan hücrelerin büyüme kapasiteleri de analiz edildi. Bu deney için, GFP^{pozitif} hücreler proliferasyon deneyinin ilk gününde (0. gün olarak kabul edildi) aynı konsantrasyonda her gün için iki kuyucuk olacak şekilde (toplam 4 gün için) ekildi (2×10^5 hücre/ml; her kuyucukta 3ml; 6-kuyucuklu plate). Takip eden 4 gün boyunca hücreler toplandı ve trypan blue ile boyanıp sayılarak hücrelerin bölünme süreleri (total hücre sayısı kullanılarak) web sayfasındaki program kullanılarak analiz edildi [Web 3].

Birbirinden bağımsız 4 deneyin ortalamaları alınarak yapılan analizler sonucunda, her iki hücre grubunda da (shDEK-B 1.9 saat, shDEK-C 7.75 saat) hücrelerin bölünme zamanlarının hafif oranda uzadığı, shDEK-C hücrelerinde görülen bu uzamanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu (Unpaired t-test, $P<0.05$) tespit edildi Şekil 8.9.



Şekil 8.9: *DEK* geni baskılanmış U266 hücrelerinin bölünme süreleri (* $P<0.05$).

Hücrelerin büyüme/çoğalma eğrilerini elde etmek amacıyla, bölünme süresi analizinde kullanılan total hücre sayıları kullanılarak ve 0. gündeki hücre sayısı “1” kabul edilerek her gün için hücrelerin 0. güne göre kaç kat çoğaldığı hesaplandı. Bu analiz sonucunda, 4 gün sonunda kontrol sh-Negatif hücrelerinin 4.6 kat, shDEK-B hücrelerin 4 kat, shDEK-C hücrelerinse 3.7 kat çoğaldığı, ve kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında shDEK-C hücrelerinde gözlenen farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu (Two-way Anova, $P<0.05$) tespit edildi Şekil 8.10. Dört bağımsız büyüme/çoğalma deneyinde her gün için belirlenmiş olan hücre canlılığının ((canlı hücre sayısı/total hücre sayısı) $\times 100$) ortalama değerleri alındı ve Tablo 8.1’de gösterildi.



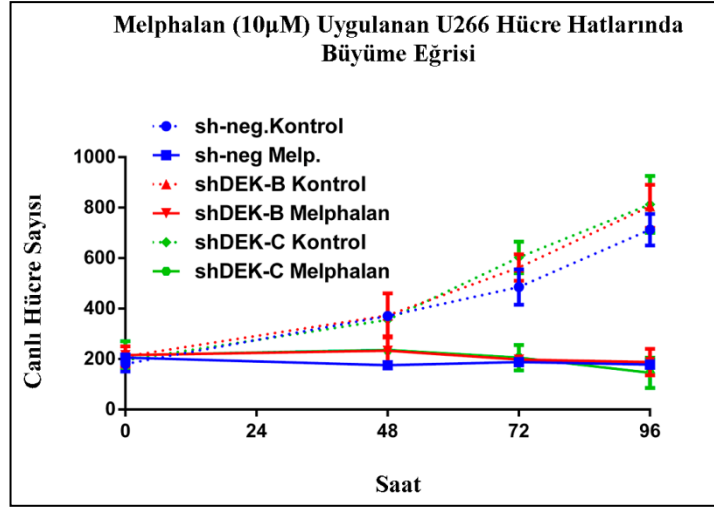
Şekil 8.10: *DEK* geni baskılanmış U266 hücrelerinin büyüme eğrileri (** $P < 0.05$).

Tablo 8.1: Dört bağımsız büyüme eğrisi ve bölünme zamanı deneyinden elde edilen hücre sayılarının aritmetik ortalaması alınarak (Canlı Hücre Sayısı/Total Hücre Sayısı $\times 100$) formülü ile belirlenen hücre canlılık oranları.

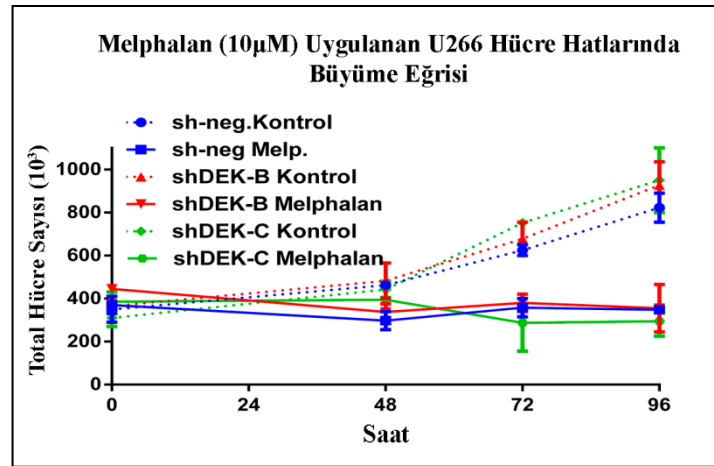
CANLILIK ORANI (%)	<u>Saat</u>				
	<u>0</u>	<u>24</u>	<u>48</u>	<u>72</u>	<u>96</u>
Hücre Grubu					
U266-sh-Negatif	87.3	86.7	90.5	92.0	92.7
U266-shDEK-B	84.3	87.2	90.7	92.3	94.2
U266-shDEK-C	87.0	88.7	92.5	93.3	93.3

8.3. Kemoterapi İlacı (Melphalan (10 μ M)) ile Muamele Edilen Hücrelerin Büyüme Eğrilerinin Belirlenmesi ve Canlılıklarının Karşılaştırılması

DEK geni baskılanmış U266 shDEK-B, shDEK-C hücre gruplarının kontrol shDEK-neg. hücrelerine göre kemoterapik ajan olan Melphalan muamelesine karşı hassasiyetinin belirlenmesi amacıyla, literatürde MM hücre hatları için belirlenmiş olan dozda (10 μ M) Melphalan ile muamele edilen hücrelerin büyüme eğrileri canlı hücre sayısı Şekil 8.11 ve total hücre sayısı Şekil 8.12 kullanılarak karşılaştırıldı. Analiz sonucunda, Melphalanla inkübasyonun, kontrol sh-neg, shDEK-B ve shDEK-C hücrelerinde benzer şekilde hücre çoğalmasını durdurduğu gösterildi Şekil 8.11 ve 8.12.

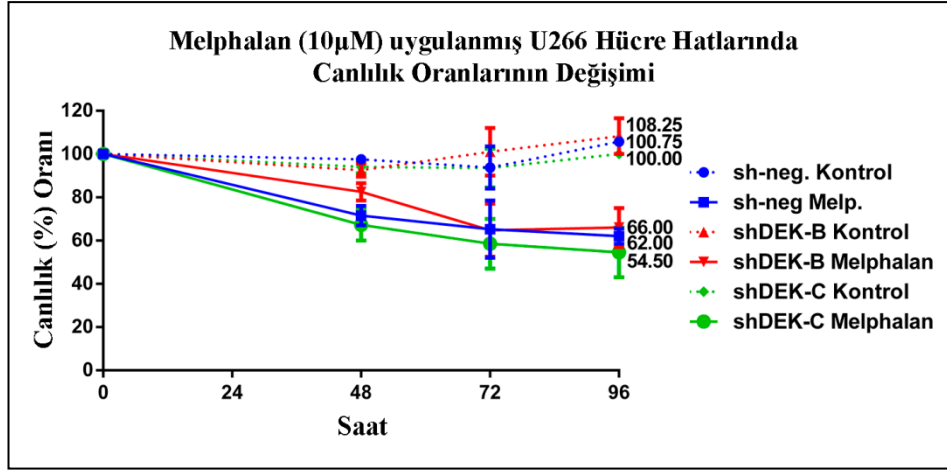


Şekil 8.11: Melphalan (10 μM) muamelesi sonucunda kontrol grubu sh-neg., shDEK-B ve shDEK-C hücrelerinin canlı hücre sayısına göre büyüme eğrileri (Kontrol: melphalan'ın çözüldüğü çözücü (vehicle) ile muamele edilmiş örnekler).



Şekil 8.12: Melphalan (10 μM) muamelesi sonucunda sh-neg., shDEK-B ve shDEK-C hücrelerinin total hücre sayısına göre büyüme eğrileri (Kontrol: melphalan'ın çözüldüğü çözücü (vehicle) ile muamele edilmiş örnekler).

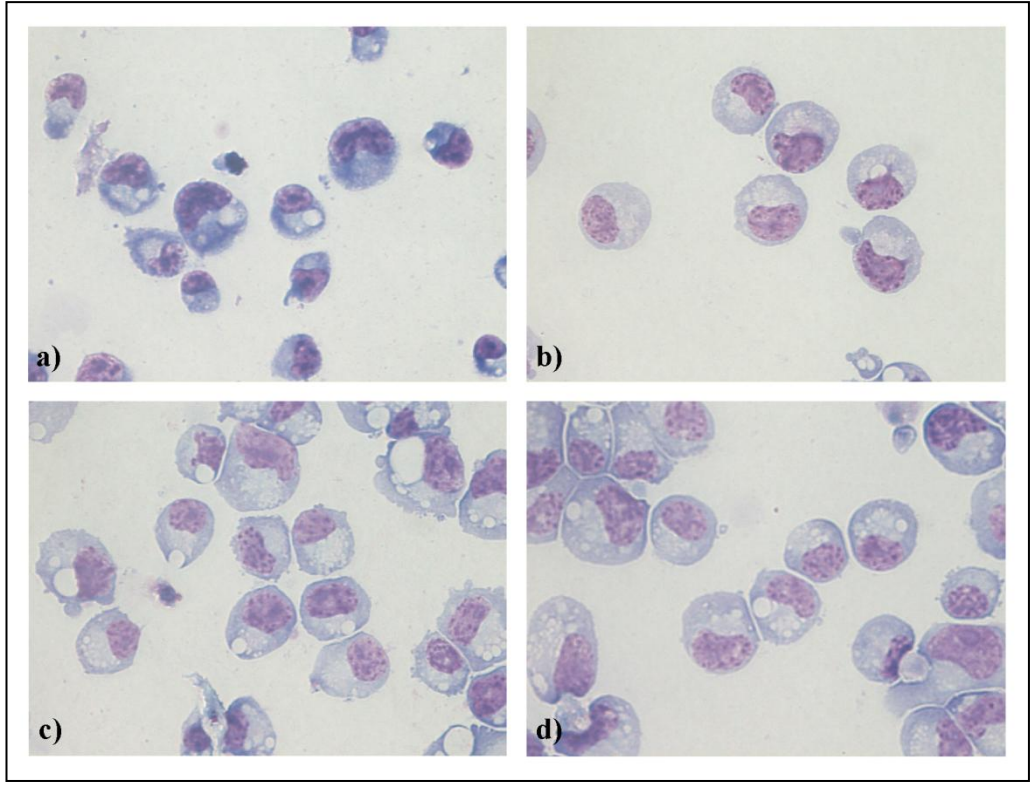
DEK geni baskılanmış hücrelerde ve kontrol hücrelerinde, kemoterapi ilacı Melphalanın, hücrelerin canlılığına etkisinin tespit etmek amacıyla, “((Canlılık oranları/ ilk sayıdaki canlılık oranları)×100) formülü ile elde edilen yüzde canlılık oranları verileri analiz edilerek karşılaştırıldı. Karşılaştırma sonucunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü Şekil 8.13.



Şekil 8.13: Melphalan (10 μ M) uygulanmış hücrelerin canlılık oranları.

8.4. Giemsa Boyama ile Hücre Morfolojisi Analizi

DEK geni baskılanmış hücrelerin büyüme eğrisi, ilaç hassasiyeti veya direnci gibi biyolojik özelliklerindeki değişimlerin yanısıra hücrelerin morfolojik özelliklerinde herhangi bir farklılık oluşup oluşmadığını belirlemek için, hücreler Giemsa boyama yöntemi ile boyanarak incelendi. Işık mikroskopunda görüntüsü alınan hücrelerin morfolojilerinde belirgin farklılık olmadığı tespit edildi Şekil 8.14.



Şekil 8.14: U266, sh-neg., shDEK-B ve shDEK-C hücrelerinin Giemsa boyama ile boyanarak ters mikroskopta çekilmiş fotoğrafları (400X). a) U266 hücreleri, b) sh-neg. hücreleri, c) shDEK-B hücreleri, c) shDEK-C hücreleri.

9. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

MM, plazma hücrelerinin kemik iliğinde çoğalmasıyla oluşan kötü huylu bir kanser türüdür [Lamy et al., 2013]. MM, hematolojik kanserlerden kaynaklı ölümlerin %19'unu, bütün kanser türlerinden kaynaklı ölümlerin de %2'sini oluşturmaktadır [Mahindra et al., 2010]. MM'nin başlangıcı ve gelişiminde, plazma hücrelerini ölümsüzleştiren bir genetik değişimin gerekli olduğunu söyleyen klasik bir bakış açısı bulunmaktadır. Son zamanlarda ise, MM'nin hücresel heterojeniteye sahip olması nedeniyle, MM'nin yayılmasının ve hastalığın devamlılığının tümörlü plazma hücrelerinden ziyade hematopoetik kök hücre ve projenitör hücrelerde ortaya çıkan MM ile alakalı onkogenik değişikliklerden kaynaklanabileceği, kromozomal anomalilerin de hastalığın oluşumunda rol alabileceği düşünülmektedir [Mahindra et al., 2010], [Vicente-Duenas et al., 2012]. Bu nedenle MM gelişiminde rol oynayan hücresel ve moleküler mekanizmaların açıklığa kavuşturulması MM'ye yönelik daha etkin tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi açısından oldukça önemlidir.

DEK proteini hücre çoğalması, farklılaşması, senesens ve apoptoz gibi birçok hücresel fonksiyonda etkilidir. Epitel hücreleriyle yapılan farklı çalışmalarda aşırı DEK ifadesinin hücre çoğalmasını arttırdığı, buna karşılık DEK ifadesinin susturulmasının hücre çoğalmasını azalttığı ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir [Sanden and Gullberg, 2015]. HeLa hücre hattında DEK ifadesinin baskılanması, tümör baskılayıcı p53 proteinin aktivitesini ve stabilizasyonunu arttırarak apoptozun indüklenmesi ile sonuçlanmıştır. Bu bulgular DEK'in epitel hücrelerinin sağ kalımında ve çoğalmasında önemli bir rol üstlenebileceği görüşünü ortaya çıkarmıştır [Wise-Draper et al., 2006].

Literatürde, olgunlaşmamış CD34⁺ kan hücresi öncülerindeki *DEK* mRNA oranının, periferik kandaki olgunlaşmış lenfositlerden 10 kat fazla olduğu ve çoğalması tetiklenen lenfositlerde kontrol grubuna göre 2-3 kat fazla DEK bulunduğu gösterilmiştir [Ageberg et al., 2006]. Bu veriler, hücrelerin çoğalma kapasitesi ile DEK ifadesi seviyesi arasında doğru orantı olabileceğini düşündürmektedir. Literatürle uyumlu olarak, laboratuvarımızda Ahmet Özdilek'in GYTE-BAP destekli yaptığı tez çalışmasında, MM ve sağlıklı kemik iliği dokularından alınan kesitlerin analizi sonucunda, DEK proteininin farklılaşmasını tamamlamış normal ve neoplastik plazma hücrelerinde (MM hücreleri)

immünohistokimyasal yöntemle tespit edilemeyecek kadar az olduğu ilk defa gösterilmiş olup [Özdilek A., 2013], bu konuda bizim bilgimiz dahilinde yayınlanmış literatür mevcut değildir. Aynı çalışmada, lenf düğümü kesitlerinin analizi sonucunda, plazma hücrelerini oluşturan farklılaşmamış ve çoğalan sentroblast hücrelerinde DEK ifadesinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Takip eden çalışmalarımızda, MM hastalarının kemik iliği örneklerinden izole edilen CD138^{pozitif} MM hücrelerinde *DEK* mRNA seviyesinin de hastaların CD138^{negatif} olan kemik iliği hücrelerine oranla yaklaşık 2-30 kat arasında azaldığı belirlenmiştir [Çakar T., 2014]. Bu tez çalışmasında *DEK* ifadesinin azalmasının MM hücrelerinin biyolojisini nasıl etkilediğini tespit etmek amacıyla, ilk olarak kontrol shRNA (sh-negatif), ve DEK'e özgün shRNA (shDEK-B ve shDEK-C) lentivirüsü ile infekte olmuş hücreler, infekte olmamış hücrelerle birlikte kültür edilmiş ve kültürde infekte olmuş hücrelerin sayısında artış olup olmadığı periyodik GFP (FACS) analiziyle incelenmiştir. Bu analiz sonucunda, DEK ifadesinin susturulmasının U266 hücrelerinin çoğalmasında çok belirgin bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür.

Bir sonraki adımda, *DEK* geni baskılanmış U266 hücrelerinin FACS ile ayrıştırıldıktan sonra büyüme kapasiteleri incelenmiştir. Bu deneyler sonucunda, kontrol sh-neg. hücrelerine göre *DEK* ifadesi susturulan shDEK-B ve shDEK-C hücrelerinin bölünme sürelerinde sırasıyla 1.9 ve 7.75 saat uzama olduğu, bu farkın shDEK-C hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda DEK geni susturulan U266 MM hücrelerinin bölünme sürelerindeki uzama literatürde bulunan epitel ve kan hücreleri verileriyle uyumluluk göstermektedir. Ayrıca, U266 hücrelerinde endojen *DEK* ifadesi oldukça düşük miktarda olup (RT-qPCR analizinde ancak 29. siklustan sonra tespit edilebilmektedir) bu hücrelerin normal bölünme süreleri de diğer pek çok hücre hattından oldukça uzundur (yaklaşık 43 saat).

Yamazaki ve arkadaşları, DEK proteinini susturdıkları epitel hücre kökenli karsinom hücre hatlarında hücrelerin çoğalmasının azaldığını ve bir kemoterapi ilacı olan "carboplatine" hassasiyetinin arttığını bildirmişlerdir [Yamazaki et al., 2015]. Çalışmamızda, DEK ifadesi baskılanan U266 hücrelerinde kısa süreli kültür ortamında Melphalan'a karşı direnç ya da hassasiyet gelişmediği gösterilmiştir. Melphalan, DNA zincirleri arasına yerleşip DNA ve RNA sentezini inhibe ederek bölünen hücrelerde sitotoksik etki göstermektedir [Web 2]. Dolayısıyla, zaten yavaş bölünen U266 hücrelerinin DEK'in baskılanması ile hafif oranda daha yavaş

bölünüyor olmasının, Melphalan toksisitesini etkilemediği düşünülmektedir. Özet olarak, TÜBİTAK 1001 (KBAG 212T108) projesi desteği ile yürütülen bu tez çalışmasında, U266 MM hücresinde *DEK* geninin susturulmasının, hücrelerin büyümesini hafif oranda yavaşlattığı ve Melphalan duyarlılığı ve hücre morfolojisinde çok belirgin farklılıklar oluşturmadığı tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında *DEK* ifadesinin normal ya da kanserli plazma hücrelerinin olgunlaşmasına olan etkileri araştırılmamış olup, elde ettiğimiz veriler *DEK*'in plazma hücresi gelişimindeki rolünü anlamayı hedefleyecek gelecekteki çalışmalarımızın temelini oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S. (2010). "Cellular and molecular immunology", 6th Edition, Philadelphia: Saunders/Elsevier.

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

Alinikula J., Lassila O., (2011), "Gene interaction network regulates plasma cell differentiation", *Scandinavian Journal of Immunology*, 73, 512-519.

Anderson K., Lutz C., van Delft F. W., Bateman C. M., Guo Y., Colman S. M., Kempinski H., Moorman A. V., Titley I., Swansbury J., Kearney L., Enver T., Greaves M. (2011), "Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia", *Nature*, 469, 356-361.

Beerman I., Maloney W. J., Weissmann I. L., Rossi D. J. (2010), "Stem cells and the aging hematopoietic system", *Current Opinion Immunology*, 22, 500-506.

Betcher D. L., Burnham N. (1990), "Melphalan", *Journal of Pediatric Oncology Nursing*, 7, 35-36.

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

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

Cabrita G. J., Ferreira B. S., da Silva C. L., Goncalves R., Almeida-Porada G., Cabral J. M. (2003), "Hematopoietic stem cells: from the bone to the bioreactor", *Trends in Biotechnology*, 21, 233-240.

Calame K. L. (2001), "Plasma cells: finding new light at the end of B cell development", *Nature Immunology*, 2, 1103-1108.

Caraux A., Perez-Andres M., Larroque M., Requirand G., Lu Z. Y., Kanouni T., Rossi J. F., Orfao A., Klein B. (2011), "Mobilization of plasma cells in healthy individuals treated with granulocyte colony-stimulating factor for hematopoietic stem cell collection", *Immunology*, 132, 266-272.

Carrasco D. R., Sukhdeo K., Protopopova M., Sinha R., Enos M., Carrasco D. E., Zheng M., Mani M., Henderson J., Pinkus G. S., Munshi N., Horner J., Ivanova E. V., Protopopov A., Anderson K. C., Tonon G., DePinho R. A. (2007), "The

differentiation and stress response factor XBP-1 drives multiple myeloma pathogenesis”, *Cancer Cell*, 11, 349-360.

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

Chu V. T., Beller A., Nguyen T. T., Steinhäuser G., Berek C. (2011), “The long-term survival of plasma cells”, *Scandinavia Journal of Immunology*, 73, 508-511.

Çakar T., (2014), “Multiple Miyeloma Hastalarında DEK Geninin Kopya Sayısı ve Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü.

Dimopoulos M. A., Terpos E. (2010), “Multiple myeloma”, *Annals of Oncology*, 21 (7), 143-150.

Doench J. G., Petersen C. P., Sharp P. A. (2003), “siRNAs can function as miRNAs”, *Genes and Development*, 17, 438-442.

Jourdan M., Caraux A., Caron G., Robert N., Fiol G., Reme T., Bollore K., Vendrell J. P., Le Gallou S., Mourcin F., De Vos J., Kassambara A., Duperray C., Hose D., Fest T., Tarte K., Klein B. (2011), “Characterization of a transitional preplasmablast population in the process of human B cell to plasma cell differentiation”, *Journal of Immunology*, 187, 3931-3941.

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

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

Lamy L., Ngo V. N., Emre N. C., Shaffer A. L., Yang Y., Tian E., Nair V., Kruhlak M. J., Zingone A., Landgren O., Staudt L. M. (2013), “Control of autophagic cell death by caspase-10 in multiple myeloma”, *Cancer Cell*, 23, 435-449.

Laubach J., Richardson P., Anderson K. (2011), “Multiple myeloma”, *Annual Review of Medicine*, 62, 249-264.

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

Leung-Hagesteijn C., Erdmann N., Cheung G., Keats J. J., Stewart A. K., Reece D. E., Chung K. C., Tiedemann R. E. (2013), “Xbp1s-negative tumor B cells and pre-plasmablasts mediate therapeutic proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma”, *Cancer Cell*, 24, 289-304.

- Logan G. E., Mor-Vaknin N., Braunschweig T., Jost E., Schmidt P. V., Markovitz D. M., Mills K. I., Kappes F., Percy M. J. (2015), "DEK oncogene expression during normal hematopoiesis and in Acute Myeloid Leukemia (AML)", *Blood Cells, Molecules Disease*, 54, 123-131.
- Mahindra A., Hideshima T., Anderson K. C. (2010), "Multiple myeloma: biology of the disease", *Blood Reviews*, 24 (1), 5-11.
- Merlini G. (2014), "Determining the significance of MGUS", *Blood*, 123, 305-307.
- Moore C. B., Guthrie E. H., Huang M. T., Taxman D. J. (2010), "Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown", *Methods in Molecular Biology*, 629, 141-158.
- Morgan G. J., Walker B. A., Davies F. E. (2012), "The genetic architecture of multiple myeloma", *Nature Reviews Cancer*, 12, 335-348.
- Muto A., Tashiro S., Nakajima O., Hoshino H., Takahashi S., Sakoda E., Ikebe D., Yamamoto M., Igarashi K. (2004), "The transcriptional programme of antibody class switching involves the repressor Bach2", *Nature*, 429, 566-571.
- Nolan K. D., Mone M. C., Nelson E. W. (2005), "Plasma cell neoplasms. Review of disease progression and report of a new variant", *Surgical Oncology*, 14, 85-90.
- Nutt S. L., Hodgkin P. D., Tarlinton D. M., Corcoran L. M. (2015), "The generation of antibody-secreting plasma cells", *Nature Reviews Immunology*, 15, 160-171.
- Nutt S. L., Taubenheim N., Hasbold J., Corcoran L. M., Hodgkin P. D. (2011), "The genetic network controlling plasma cell differentiation", *Seminar in Immunology*, 23, 341-349.
- Oancea C., Ruster B., Henschler R., Puccetti E., Ruthardt M. (2010), "The t(6;9) associated DEK/CAN fusion protein targets a population of long-term repopulating hematopoietic stem cells for leukemogenic transformation", *Leukemia*, 24, 1910-1919.
- Oliva L., Cenci S. (2014), "Autophagy in plasma cell pathophysiology", *Frontiers in Immunology*, 5, 103.
- Oracki S. A., Walker J. A., Hibbs M. L., Corcoran L. M., Tarlinton D. M. (2010), "Plasma cell development and survival", *Immunological Reviews*, 237, 140-159.
- Özdilek A., (2013), "Multiple Miyeloma Hastalarında İmmünohistokimya Yöntemi ile DEK Protein Seviyesinin Belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü.
- Pieper K., Grimbacher B., Eibel H. (2013), "B-cell biology and development", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131, 959-971.

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

Rajkumar S. V., Dimopoulos M. A., Palumbo A., Blade J., Merlini G., Mateos M. V., Kumar S., Hillengass J., Kastritis E., Richardson P., Landgren O., Paiva B., Dispenzieri A., Weiss B., LeLeu X., Zweegman S., Lonial S., Rosinol L., Zamagni E., Jagannath S., Sezer O., Kristinsson S. Y., Caers J., Usmani S. Z., Lahuerta J. J., Johnsen H. E., Beksac M., Cavo M., Goldschmidt H., Terpos E., Kyle R. A., Anderson K. C., Durie B. G., Miguel J. F. (2014), "International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma", *The Lancet Oncology*, 15, e538-548.

Rellick S. L., Piktel D., Walton C., Hall B., Petros W., Fortney J. E., Gencheva M., Denvir J., Hobbs G., Craig M., Gibson L. F. (2012), "Melphalan exposure induces an interleukin-6 deficit in bone marrow stromal cells and osteoblasts", *Cytokine*, 58, 245-252.

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

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

San Miguel J.F., Schlag R., Khuageva N. K., Dimopoulos M. A., Shpilberg O., Kropff M., Spicka I., Petrucci M. T., Palumbo A., Samoilova O. S., Dmoszynska A., Abdulkadyrov K. M., Schots R., Jiang B., Mateos M. V., Anderson K. C., Esseltine D. L., Liu K., Cakana A., van de Velde H., Richardson P. G. (2008), "Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma", *The New England Journal of Medicine*, 359, 906-917.

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

Shapiro-Shelef M., Calame K. (2004), "Plasma cell differentiation and multiple myeloma", *Current Opinion in Immunology*, 16, 226-234.

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

Taha I. A., Ahmad R. A., Rogers D. W., Pritchard J., Rogers H. J. (1983), "Pharmacokinetics of melphalan in children following high-dose intravenous injection", *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 10, 212-216.

Vicente-Duenas C., Romero-Camarero I., Garcia-Criado F. J., Cobaleda C., Sanchez-Garcia I. (2012), "The cellular architecture of multiple myeloma", *Cell Cycle*, 11, 3715-3717.

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

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

Yamazaki H., Iwano T., Otsuka S., Kagawa Y., Hoshino Y., Hosoya K., Okumura M., Takagi S. (2015), "SiRNA knockdown of the DEK nuclear protein mRNA enhances apoptosis and chemosensitivity of canine transitional cell carcinoma cells", *The Veterinary Journal*, 204, 60-65.

Web1, (2015), <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/melphalan#section=Top>, (Eriřim Tarihi: 14.06.2015).

Web2, (2015), <http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug?cdrid=42973>, (Eriřim Tarihi: 14.06.2015).

Web3, (2015), <http://www.doubling-time.com/compute.php>, (Eriřim Tarihi: 02.01.2015).

Web4, (2015), <http://www.origene.com/assets/Documents/HuSH/AppGuideHuSH29.pdf>, (Eriřim Tarihi: 30.06.2015).

ÖZGEÇMİŞ

Emrah ÖZÇELİK 17.07.1987 yılında Ankara'da doğdu. Lisans eğitimini 2005-2010 yılları arasında Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde tamamladı. 2013 yılının Güz döneminde Gebze Teknik Üniversitesi (GTÜ), Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans başlayan ve eğitimine devam eden Emrah Özçelik aynı zamanda GTÜ, Temel Bilimler Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde araştırma görevlisi olarak çalışmalarını sürdürmektedir.

EKLER

Ek A: Telif Hakkı Bulunan Şekiller İçin Alınan İzinler

Tablo A1.1: Telif hakkı bulunan şekiller için alınan izinler

Şekil No	Lisans Tarihi	Lisans No	Telif Sahibi
2.1	13.07.2015	3667030974524	Nature Publishing Group
3.1	13.07.2015	3667051171062	Elsevier
4.1	13.07.2015	3667030298960	Elsevier
4.2	13.07.2015	3667051490789	Elsevier
4.3	13.07.2015	3667060399109	Nature Publishing Group
4.4	13.07.2015	3667060705402	John Wiley and Sons
5.1	13.07.2015	3667060993377	Nature Publishing Group
5.2	13.07.2015	3667061244167	Elsevier