

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ PROGRAMI DOKTORA TEZİ

FOLLİKÜLER LENFOMALARDA MİKROÇEVRENİN ORGANİZASYONUNDA
TGF β /SMAD YOLAĞININ ROLÜ VE PROGNOZLA İLİŞKİSİ

Şenay KÖM

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Işınsu KUZU

Mart

2020

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Şenay KÖM

İmzası

ONAY

Prof. Dr. Işinsu KUZU danışmanlığında Şenay KÖM tarafından hazırlanan bu çalışma 3 Mart 2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ

İmza:

Üye: Prof. Dr. Işinsu KUZU

İmza:

Üye: Prof. Dr. Kamil Can AKÇALI

İmza:

Üye: Doç. Dr. Ali Osmay GÜRE

İmza:

Üye: Doç. Mustafa Mert SÖZEN

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Foliküler Lenfomalarda Mikroçevrenin Organizasyonunda TGF β /Smad Yolağının Rolü ve Prognozla İlişkisi

Şenay KÖM

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Işınso KUZU

Germinal merkez B hücrelerinden kaynaklanan Foliküler lenfoma (FL) dünyada en sık rastlanan ikinci lenfoma alt tipidir. Genellikle yavaş klinik seyirli lenfomalar arasında sayılmalarına rağmen hastalar farklı klinik seyir gösterebilmektedir. Foliküler lenfoma vakalarının %30-40 kadarı, agresif karakterli diffüz büyük B hücreli lenfomaya (DBBHL)'ye ilerleyebilmektedir. T(14;18)(q32;q21) translokasyonu FL'da % 85-90 oranında en sık görülen genetik değişikliktir.

Bu zamana kadar, FL'da yaş, evre, grade, tümör yükü, kemik iliği tutulumu, serum laktat dehidrojenaz (LDH), hemoglobin ve beta2 mikroglobulin (B₂ mikroglobulin) gibi birçok klinik prognostik faktör tanımlanmıştır. Bu faktörlerin dışında hastalık mikroçevresinin prognozda çok önemli bir etken olduğu çeşitli çalışmalarca gösterilmiştir. FOXP3 ifade eden Treg hücrelerinin (Treg) mikroçevrede artmış olması daha iyi genel sağ kalım ile ilişkilendirilirken, mikroçevrede makrofajların artışı daha kötü klinik gidiş ile ilişkisi bildirilmiştir. Ancak mikroçevre klinik davranış ilişkisini ortaya koyan çalışmalarda elde edilen sonuçlar birbirleriyle çelişmektedir.

Bu bilgilerden yola çıkılarak, bu tez çalışmasında, tümör mikroçevresi üzerinde etkisi olduğu düşünülen TGF β /Smad yolağındaki genlerin ifade değişimlerinin, foliküler lenfoma örneklerinde klinik/patolojik prognostik parametreler ile ilişkisinin anlaşılması hedeflenmiştir. 21 FL vakası ve kontrol grubunu oluşturan 5 reaktif foliküler hiperplazi vakasında, regülatör T hücrelerin varlığının tespiti için FOXP3 ve tümör ilişkili makrofajların varlığının tespiti için de CD163 antikorları ile immunohistokimyasal inceleme yapılmıştır. FL örneklerinde lazer mikrodiseksiyon yöntemi ile ayrıştırılan neoplastik foliküllerden ve kontrol grubundan elde edilen RNA'lar ile TGF β /Smad yolağında yer alan TGFBR1, Smad2, Smad3, Smad4, Smad6, Smad7, SARA ve CDKN2B genlerinin ifade düzeyleri qRT-PCR yöntemi ile incelenmiştir. Bu analizler sonucunda elde edilen bulgular ile histopatolojik-klinikopatolojik prognostik veriler arasındaki ilişki istatistik analizler ile araştırılmıştır. Bu istatistiksel araştırmalardan sonra elde edilen veriler arasında anlamlı herhangi bir korelasyon olmadığı saptanmıştır.

Bu tez çalışması 18H0230001 numaralı proje ile Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

Keywords; Foliküler lenfoma, prognoz, mikroçevre, TGF β /Smad yolağı

2020, 148 sayfa

ABSTRACT

PhD Thesis

The Role Of Transforming Growth Factor β (TGF β)/ Smad Pathway In Microenvironment Organization Of Follicular Lymphoma And Its Relevance To Prognosis

Şenay KÖM

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Isinsu KUZU

Follicular lymphoma (FL) caused by germinal central B cells is the second most common lymphoma subtype. Although they are considered as indolent lymphomas, patients may have a wide variety of clinical course. 30-40 % of cases of follicular lymphoma are transformed into aggressive characterized diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), which is also of germinal origin. T(14; 18) (q32; q21) translocation is the most important genetic marker of FL and is observed in 85-90% of FL cases.

To date, many clinical prognostic factors have been identified including factors such as age, stage, grade, tumor burden, bone marrow involvement, serum lactate dehydrogenase (LDH), hemoglobin and b-microglobulin. Beside these factors, various studies have shown that the microenvironment of the disease is a very important factor in prognosis. Increased number of FOXP3-expressing T cells (Treg) in microenvironment was associated with better overall survival, while higher macrophage content was associated with poorer clinical outcome. However, the results obtained from the studies on this subject may contradict each other.

Based on this information, in this thesis, it is aimed to understand the relationship between the expression changes of genes in the TGF β / Smad pathway, which are thought to have an effect on tumor microenvironment, with clinical / pathological prognostic parameters in follicular lymphoma samples. In 21 cases of FL and 5 reactive follicular hyperplasia cases that constitute the control group, immunohistochemical examination was performed with the antibodies FOXP3 to detect the presence of regulator T cells and CD163 antibodies for the presence of tumor-associated macrophages. RNA was extracted from the neoplastic follicles in FL samples and reactive follicles in control group which were separated by laser microdissection method. The expression levels of TGFBR1, Smad2, Smad3, Smad4, Smad6, Smad7, SARA and CDKN2B genes in the TGF β / Smad pathway were examined by the qRT-PCR method. The relationship between the findings obtained as a result of these analyzes and histopathological-clinicopathological prognostic data were investigated by statistical analysis. No significant correlation was found between the data obtained after these statistical studies.

This thesis was supported by Ankara University Scientific Research Projects Coordinator with the project numbered 18H0230001.

Keywords: Follicular lymphoma, prognosis, microenvironment, TGF β / Smad pathway

2020, 148 pages

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başladığım günden doktora sürecimin sonuna kadar beni her konuda destekleyen, yol gösteren ve öğrencisi olduğum için her zaman şanslı hissettiren değerli danışmanım Prof. Dr. Işinsu KUZU'ya çok teşekkür ederim.

Vaka seçimi ve hasta bilgilerine erişim konusundaki desteklerinden dolayı sayın Prof. Dr. Muhit Özcan'a, iyi niyetli ve yapıcı eleştirileriyle tezimin şekillenmesinde ve tez çalışmalarımnda Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü laboratuvarlarından faydalanmam için desteğini esirgemeyen, tez izleme komitesi üyesi sayın hocam Prof. Dr. Kamil Can AKÇALI'ya, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü merkez laboratuvarı altyapısı ile çalışmalarımı yürütmeme imkan sağladığı ve tezimin gelişiminde gerek fikinsel gerekse de analizler konusunda fiilen yardımcı olduğu için tez izleme komitesi üyesi olan sayın hocam Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a teşekkür ederim.

Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü öğretim üyesi Dr. Orkun CEVHEROĞLU'na, çok meşakkatli bir işlem olan lazer mikrodiseksiyon aşamasındaki desteklerinden ötürü çok teşekkür ederim. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nde gerçekleştirdiğim çalışmalar süresince bana yardımcı olan Ece ABACI'ya çok teşekkürler.

Bu zorlu süreçte yanımda olan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı ailesine, özellikle değerli arkadaşlarım Cemile İĞDELI'ye, Hazel SERTKAYA AYDOĞAN'a, Merve BAKIRCI BESLER'e, Burcu ÇEVİK'e, Dr. Yasemin ŞAHİN'e, Şinasi AYGÜN'e ve Laleh MADAYEN'e bütün destekleri ve varlıklarıyla daha güçlü hissettirdikleri için teşekkür ederim.

Her zaman olduğu gibi doktora sürecimde de bana sonuna kadar destek olan ve inanan çok değerli aileme yürekten teşekkür ederim.

Doktora sürecimin başından sonuna kadar birçok noktada emeği geçen, çıkmaza girdiğim bütün anlarda elimi bırakmayıp, yoluma devam etmemi sağlayan sevgili eşim Dr. Deniz KÖM'e çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	2
2.1. KANSER	2
2.2. FOLLİKÜLER LENFOMA	5
2.2.1. FOLLİKÜLER LENFOMANIN DAĞILIM ÖZELLİKLERİ – EPİDEMİYOLOJİ	5
2.2.2. FOLLİKÜLER LENFOMANIN TUTULUM ALANLARI	6
2.2.3. FOLLİKÜLER LENFOMANIN ETİYOLOJİSİ.....	6
2.2.4. FOLLİKÜLER LENFOMANIN KLİNİK ÖZELLİKLERİ	6
2.2.5. FOLLİKÜLER LENFOMANIN ÖZELLİKLERİ	7
2.2.5.1. Folliküler Lenfomanın Morfolojisi	7
2.2.5.1.1. Folliküler Lenfomada Grade.....	8
2.2.5.2. Folliküler Lenfomanın Fenotipi.....	9
2.2.5.3. Folliküler Lenfomanın Moleküler Patogenezi	10

2.2.5.4. Histolojik Transformasyon	13
2.2.6. TANI VE EVRELEME	14
2.2.7. FOLLİKÜLER LENFOMA PROGNOZU	15
2.2.8. FOLLİKÜLER LENFOMADA TEDAVİ.....	16
2.2.9. FOLLİKÜLER LENFOMA VE MİKROÇEVRE	19
2.2.9.1. REGÜLATÖR T HÜCRELERİ (TREG)	22
2.2.9.1.1. Uyarılmış Regülatör T Hücreleri (iTreg).....	23
2.2.9.2. TÜMÖR İLİŞKİLİ MAKROFAJLAR	25
2.3. TGFB/ SMAD YOLAĞI	28
2.3.1. TGFB/ SMAD YOLAĞI ELEMANLARI.....	29
2.3.1.1. Ligandlar	29
2.3.1.2. Ekstrasellüler Ligand Bağlayıcı Proteinler	30
2.3.1.3. Heterodimerik Serin/Treonin Kinaz Reseptör Sinyal Kompleksi	30
2.3.1.4. Smadlar	32
2.3.2. TGFB/SMAD YOLAĞININ REGÜLASYON MEKANİZMALARI	34
2.3.2.1. TGFB RESEPTÖR KOMPLEKS AKTİVİTE REGÜLASYONU	34
2.3.2.2. SMAD SEVİYELERİNİN REGÜLASYONU	35
2.3.2.3. SMAD HEDEF GENLERİNİN REGÜLASYONU	36
2.3.2.4. SMAD AKTİVASYONUNUN REGÜLASYONU	37
2.3.3. TGFB/SMAD YOLAĞI VE KANSER.....	37
2.3.3.1. TGFB/SMAD YOLAĞI VE LENFOMAGENEZ	41
2.4. LAZER MİKRODİSEKSİYON	43
2.4.1. INFRARED LMD (IR-LMD)	43

2.4.2. UV-LMD	44
2.4.3. LMD’NİN AVANTAJ VE DEZAVANTAJLARI	45
2.4.4. LEİCA LMD SİSTEMLERİ	45
<u>3. GEREKÇE VE AMAC.....</u>	47
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u>	48
4.1. MATERYAL	48
4.2. YÖNTEM	48
4.2.1. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ANALİZLER	48
4.2.2. LAZER MİKRODİSEKSİYON (LMD)	50
4.2.2.1. LMD öncesi hazırlıklar	50
4.2.2.2. FFPE dokulardan kesit alınması	50
4.2.2.3. Deparafinizasyon	51
4.2.2.4. Kesitlerin Toluidin Blue ile Boyanması	51
4.3. RNA İZOLASYONU.....	52
4.4. CDNA SENTEZİ VE OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI	54
4.5. PRİMERLERİN ÇALIŞMA ŞARTLARININ BELİRLENMESİ	55
4.5.1. GENLERİN İFADE DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ ÖNCESİ PRİMERLERİN QRT-PCR OPTİMİZASYONLARI	57
4.6. QRT-PCR ANALİZLERİ.....	58
4.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	60
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	61
5.1. DEMOGRAFİK BULGULAR	61
5.1.1. FOLLİKÜLER LENFOMA GRADE DAĞILIMI.....	61

5.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR	61
5.3. KLİNİK BULGULAR	65
5.4. LMD VE RNA İZOLASYON SONUÇLARI.....	66
5.5. CDNA SENTEZİ VE OPTİMİZASYON SONUÇLARI	67
5.6. PCR OPTİMİZASYON SONUÇLARI	67
5.7. QRT-PCR OPTİMİZASYON SONUÇLARI	69
5.8. QRT-PCR SONUÇLARI.....	70
5.9. İSTATİSTİK DEĞERLENDİRME SONUÇLARI.....	77
<u>6. TARTIŞMA VE SONUC.....</u>	<u>79</u>
6.1. TARTIŞMA.....	79
6.2. SONUÇ.....	93
<u>7. KAYNAKLAR</u>	<u>94</u>
<u>8. ÖZGEÇMİŞ.....</u>	<u>130</u>
<u>9. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR</u>	<u>132</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Global kanser verileri	3
Şekil 2.2. Türkiye’de erkeklerde kanser tiplerinin görülme oranı.....	4
Şekil 2.3. Türkiye’de kadınlarda kanser tiplerinin görülme oranı.....	4
Şekil 2.4. Folliküler lenfomalarda histolojik grade mikroskopik örnekleri	9
Şekil 2.5. B hücreli lenfomaların gelişim basamakları	11
Şekil 2.6. Folliküler Lenfoma Patogenezi	12
Şekil 2.7. Folliküler Lenfoma Tedavi Seçenekleri	16
Şekil 2.8. Folliküler Lenfoma Mikroçevresi	19
Şekil 2.9. TGFB Kanonik ve Kanonik Olmayan Yolak.....	29
Şekil 2.10. TGFβ sinyal yolağını gösterir KEGG haritası.....	31
Şekil 2.11. Smad aile domain yapısı	33
Şekil 2.12. TGFβ reseptörü ve Smad aktivasyonunun mekanizması	34
Şekil 2.13. Leica LMD6 sistemleri.....	45
Şekil 4.1. LMD öncesi ve sonrası doku görselleri.....	52
Şekil 5.1. FL grade II vakalarda skor 1 FOXP3, skor 0 CD163 ve BCL2 mikroskop görüntüleri.	63
Şekil 5.2. FL grade II vakalarda skor 2 FOXP3, skor 0 CD163 ve BCL2 mikroskop görüntüleri.	63
Şekil 5.3. FL grade III vakalarda skor 3 FOXP3, Skor 2 CD163, BCL2 mikroskop görüntüleri.	64
Şekil 5.4. cDNA örnekleri için yapılan Actin PCR ürünleri agaroz jel görüntüsü 1	67

Şekil 5.5. cDNA örnekleri için yapılan Actin PCR ürünleri agaroz jel görüntüsü 2	68
Şekil 5.6. CDKN2B, SMAD7, ZFYVE9, SMAD6 optimizasyon dijital jel görüntüsü (QIAxcel).....	68
Şekil 5.7. SMAD2, TGFβR1, SMAD3, SMAD4 optimizasyon dijital jel görüntüsü (QIAxcel).....	68
Şekil 5.8. Melting curve eğrileri.....	69
Şekil 5.9. TGFβR1 gen ifade değişimini gösterir grafik.....	72
Şekil 5.10. SMAD2 gen ifade değişimini gösterir grafik.....	72
Şekil 5.11. SMAD3 gen ifade değişimini gösterir grafik.....	73
Şekil 5.12. SMAD4 gen ifade değişimini gösterir grafik.....	73
Şekil 5.13. SMAD7 gen ifade değişimini gösterir grafik.....	74
Şekil 5.14. SARA gen ifade değişimini gösterir grafik.....	74
Şekil 5.15. CDKN2B gen ifade değişimini gösterir grafik.....	75
Şekil 5.16. Smad3 ve Smad4 reaksiyonlarına ait jel görüntüsü.....	75
Şekil 5.17. TGFβR1 ve CDKN2B reaksiyonlarına ait jel görüntüsü.....	76
Şekil 5.18. Smad7 ve Sara reaksiyonlarına ait jel görüntüsü	76
Şekil 5.19. Smad6 reaksiyonlarına ait jel görüntüsü	76
Şekil 5.20. Smad2 reaksiyonlarına ait jel görüntüsü	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Ann Arbor Evreleme Sistemi	14
Çizelge 2.2. Lugano Evreleme Kriterleri.....	14
Çizelge 2.3. FLIPI ve FLIPI-2 Risk Tablosu.....	15
Çizelge 4.1. cDNA sentezi genomik DNA eliminasyon aşaması protokolü.....	55
Çizelge 4.2. cDNA sentezi reverse-trasnkripsiyon aşaması protokolü	55
Çizelge 4.3. Tez çalışmasında kullanılan primer setleri, Qiagen.	56
Çizelge 4.4. Primer bağlanma ısılarının optimizasyonunda uygulanan gradient PCR protokolü.....	56
Çizelge 4.6.Rotor-Gene Cihaz protokolü	57
Çizelge 4.7. RT-PCR karışımı.....	59
Çizelge 4.8. LightCycler 480 Cihaz Programı	59
Çizelge 5.1. LMD ile seçilen toplam alan, RNA konsantrasyon ve saflık bilgileri	66
Çizelge 5.2. Örneklere ait ortalama CT değerlerini gösterir tablo.	71
Çizelge 5.3. FL hastalarının TGFβ/Smad yolağında yer alan gen ifade değişimlerinin kontrol grubu ile istatistiksel karşılaştırılması (Non parametrik Mann whitney U testi).....	77
Çizelge 5.4. İmmunhistokimyasal mikroçevre ilişkili belirteçler ve proliferasyon indeksi ile TGFβ/Smad yolağındaki genlerin ifadelerinin istatistiksel karşılaştırılması (Non parametrik Mann whitney U testi).	78
Çizelge 5.5. FLIPI skorları, kemik iliği tutulumu ile TGFβ/Smad yolağındaki genlerin ifadelerinin istatistiksel karşılaştırılması (Non parametrik Mann whitney U testi).....	78

SİMGELER DİZİNİ

µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
FL	Foliküler Lenfoma
DBBHL	Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma
WHO	World Health Organization
FLIPI	Follicular Lymphoma International Prognostic Index
LDH	Laktat Dehidrojenaz
HMT	Histon Metil Transferaz
MH1	Mad Homology Domain 1
TİM	Tümör ilişkili makrofaj
Treg	Regülatör T hücresi
LMD	Lazer Mikrodiseksiyon
RNA	Ribonükleik Asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
cDNA	Complementary DNA (Komplementer DNA)
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue (Formalinle fikse edilmiş blok dokusu)
PCR	Polimerase Chain Reaction (polimeraz zincir reaksiyonu)
QRT-PCR	Quantitative Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction (Kantitatif ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu)

1. GİRİŞ

Lenfomalar, Hodgkin lenfoma ve Hodgkin-dışı (Non-Hodgkin) lenfomalar olmak üzere iki temel gruba ayrılır. Klasik Hodgkin lenfomada (CHL), lenf nodlarında Reed-Sternberg hücreleri olarak adlandırılan büyük, anormal lenfositler bulunur (1). Non-Hodgkin lenfomalar (NHL), lenfoid sistemden kaynaklanan heterojen bir hastalık grubunu temsil eder. Batıda NHL'lerin çoğunu B hücreli lenfomalar oluşturur (2).

2015 Türkiye Kanser istatistiklerine göre, tüm yaş gruplarındaki kanser türleri arasında, NHL'ler erkek bireylerde %2,8 ile altıncı, kadın bireylerde %2,8 ile sekizinci sırada görülme sıklığına sahiptir (3). Non-Hodgkin lenfomaların alt tipi olan Folliküler lenfoma (FL), dünyada en sık rastlanan ikinci lenfoma alt tipidir, özellikle Batı ülkelerinde görülme sıklığı giderek artmaktadır (4). FL vakalarında çok çeşitli klinik seyirler mevcuttur. Bazı vakalar yıllarca fark edilmeden sınırlı kalıp veya tek lokalizasyonda tedavisi izlenen yavaş klinik seyirli iken, bazıları agresif davranış gösterirler. Agresif davranış gösteren vakalar diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL)'ya histolojik dönüşüm gösterirler. FL hastaları genelde ileri evrede tespit edilir, yalnızca %26-33 evre I/II'de tespit edilir (4). Histolojik transformasyon hastaların %30-40'ında görülür ve bu oran hastalıkla geçirilen her yıl için %3'tür (1). Ortalama genel sağ kalım bütün FL hastalarında 6-10 yıl iken, yüksek dereceye transformasyon durumunda hastaların sağkalımı 1 yıl olabilmektedir (5). Son yıllarda yapılan çalışmalar, folliküler lenfomanın prognozunda klinik ve laboratuvar verilerin rolüyle birlikte tümör mikroçevresinin kritik önemini ortaya koymuştur (6). Neoplastik hücreler dışındaki tümör mikroçevresindeki diğer hücrelerin bu karmaşık durumun anlaşılmasındaki etkisi giderek artmaktadır.

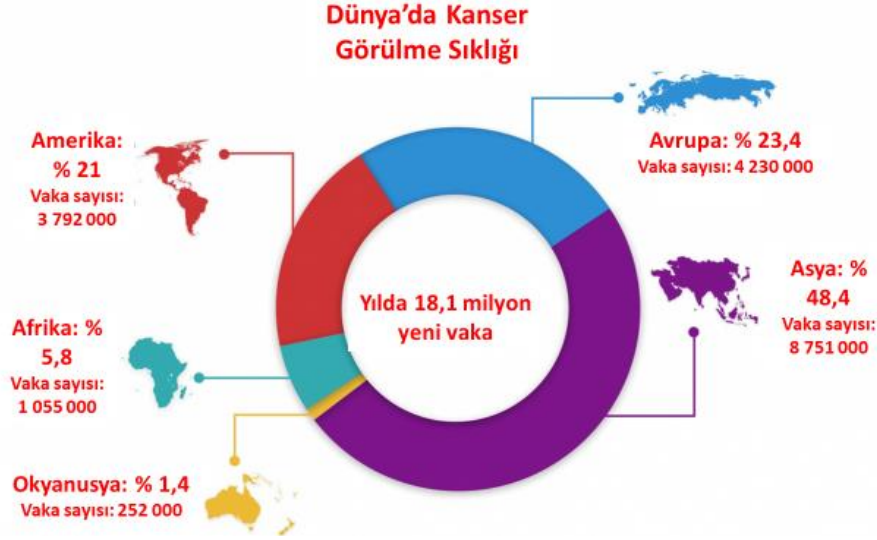
2. KURAMSAL TEMELLER

Lenfomalar, lenfoid organlar ve ektranodal dokularda gelişmekte olan lenfositlerden kaynaklanan heterojen bir kanser grubudur. Güncel WHO sınıflandırması, lenfomaları öncelikli olarak morfoloji, immün fenotip, genetik değişiklikler ve klinik özelliklere göre 35'ten fazla farklı antiteye sınıflandırmıştır (2).

Foliküler lenfomalar germinal merkez B hücrelerinden kaynaklanan bir Non-Hodgkin lenfoma alt tipidir. Foliküler lenfoma, klinik seyir ve tedavi seçenekleri açısından çok fazla çeşitlilik gösterir. Bu lenfoma grubundaki prognostik çeşitlilik yakın zamana kadar, evre, tümör yükü, kemik iliği tutulumu, sistemik semptomlar, performans durumu, serum laktat dehidrojenaz (LDH), hemoglobin, eritrosit sedimentasyon oranı ve Beta2 mikroglobulin gibi faktörlerle ilişkilendirilmekteydi. Ancak neoplastik hücreler ile tümör mikroçevresindeki diğer hücrelerin oluşturduğu kompozisyonun klinik seyir üzerindeki kritik etkisi, araştırmacıların FL hücre hatlarını besleyici hücreler ya da sitokinlerin ürettiği sağ kalım sinyalleri olmadan çoğaltamamaları sonucunda ortaya çıkmıştır (6).

2.1. KANSER

Normal hücre gelişimi ve ölümü arasındaki dengeyi sağlayan, karmaşık genetik ve biyokimyasal süreçler hücrelerin yaşamını kontrol eder. Bu kontrol mekanizmalarının herhangi birinde ya da birçoğunda meydana gelen dengesizlikler ve aksaklıklar hücre gelişimi sürecindeki akışı bozar. Bu akışın bozulması sonucu hücre bölünmesinin kontrolden çıkması kanserleşme veya diğer genel terminoloji ile neoplastik sürecin zeminini hazırlamaktadır (7).

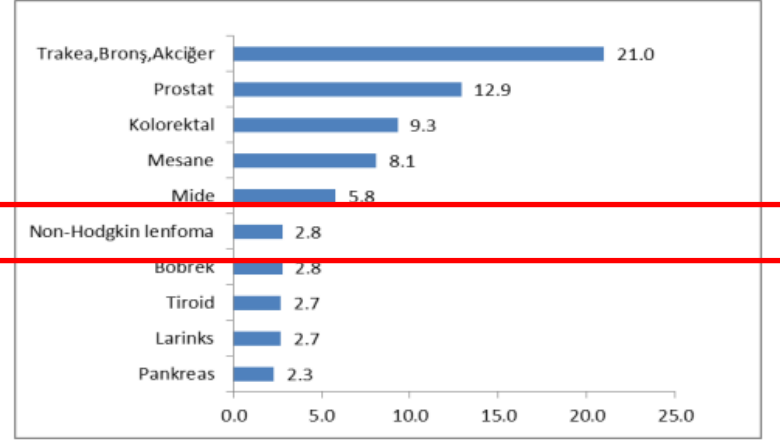


Şekil 2.1. Global kanser verileri (8).

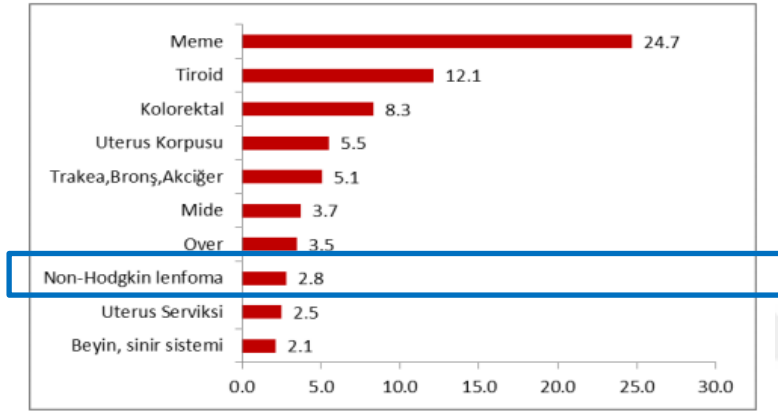
Kanser, kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra dünyada ikinci ölüm nedenidir. 2018’de dünya çapında 18,1 milyon yeni kanser vakası ortaya çıkarken, 9,6 milyon kanser kaynaklı ölüm meydana gelmiştir. Global olarak 8 erkekten 1’i, 11 kadından 1’i kanserden hayatını kaybetmektedir (Şekil 2.1.) (9).

Her iki cinsiyetteki sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, akciğer kanseri bütün kanser vakalarının %11,6’sını oluşturarak en çok tanı konulan kanser türüdür ve kanser kaynaklı ölümlerin %18,4’ünü oluşturmaktadır. Kanser kaynaklı ölümlerin %11,6 ile akciğer kanserini takip eden meme kanseri, %7,1 ile prostat kanseri, %6,1 ile kolorektal kanser izlemektedir. Non-Hodgkin lenfomalar ise %2,8 yeni vaka ve %2,6 ölüm oranı ile kanserler içerisinde 13. sırada yer almaktadır (10).

TÜİK Mayıs 2017 verilerine göre Türkiye’de her 5 ölümden 1’i kanser kaynaklıdır (11). Amerikan Kanser Derneği’nin 2015’te yayınladığı kanser atlasına göre, Türkiye’de her yıl 148 bin civarında yeni kanser tanısı ve 91800 kanser bağlı ölüm meydana gelmektedir (12).



Şekil 2.2. Türkiye’de erkeklerde kanser tiplerinin görülme oranı (3).



Şekil 2.3. Türkiye’de kadınlarda kanser tiplerinin görülme oranı (3).

T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından 2018’de yayınlanan Türkiye Kanser İstatistikleri 2015’e ait verilere göre kanser ülkemizde ve dünyada ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Dünyada her 6 ölümden biri, ülkemizde ise her 5 ölümden birinin nedeni kanserdir. 2015 verilerine göre, tüm yaş gruplarında, erkeklerde akciğer kanseri %21 oranla ilk sırada, prostat kanseri %12,9 ve kolorektal kanser %9,3 oranla akciğer kanserini takip etmektedir. Non-Hodgkin lenfomalar ise erkeklerde en sık rastlanan kanser türlerinde %2,8 ile altıncı sırada yer almaktadır. Kadınlarda ilk sırada %24,7 ile meme kanseri bulunurken, tiroid kanseri %12,1 ve kolorektal kanser %8,3 oranla takip etmektedir. Non-Hodgkin lenfomalar %2,8 ile kadınlarda en sık rastlanan sekizinci kanser türüdür (Şekil 2.2-3) (3).

2.2. FOLLİKÜLER LENFOMA

Foliküler lenfoma, B lenfositlerin adaptif immün yanıt aşamasında antijene özgü antikor oluşturması yolunda organize olan germinal merkez hücrelerinden köken almaktadır. Reaktif germinal merkez hücrelerinin çoğalmasının temelinde antijen uyarısı bulunmaktadır. FL'da folikül yapısını oluşturan neoplastik hücreler, küçük-orta boyutlu sentrositler ve/veya büyük boyutlu sentroblastlar veya transforme hücreler olabilir. FL'da neoplastik folliküller içinde bulunan sentrositler ve sentroblastların oranına göre histolojik derecelendirme yapılır. Bu derecelendirme hastalığın klinik davranışı ile ilişkilidir (13). FL için WHO sınıflandırmasında dört varyant tanımlanmıştır. Lenf nodülünde ortaya çıkan nodal formlar en yaygın görülürler. En erken evre olarak in situ folliküler neoplazi tanımlanmıştır. Daha seyrek olarak lenf nodülü dışında ektranodal FL'lar da görülebilir. Duodenal tip folliküler lenfomanın morfolojik, fenotipik ve moleküler özellikleri, nodal FL ile ortak olsa da klinik özellikleri bakımından farklıdır. Bu sebeple yeni sınıflamada ayrı bir varyant olarak kabul edilmiştir. Testiküler FL da yeni sınıflamada ayrı varyant olarak kabul edilmiştir. Bazı vakalarda fenotipik bulgular aynı olmasına rağmen folliküler paternin bulunmadığı durumlar diffüz varyant olarak kabul edilmiştir (13). Hastalık gelişim süresinden sonra geçen zaman içinde histolojik derece artışı görülür. Vakaların sağ kalım süreleri içinde %25-35 oranında hastalık diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL)'ya dönüşmektedir. Hastalık gelişiminde t(14;18)(q32;q21) (IGH-BCL2) genetik anomalisi ve bunun sonucu ortaya çıkan anti apoptotik protein BCL2'nin transkripsiyonel regülasyon bozukluğu ile ifade artışı tanımlayıcı olarak belirtilmiştir.

2.2.1. FOLLİKÜLER LENFOMANIN DAĞILIM ÖZELLİKLERİ – EPİDEMİYOLOJİ

Foliküler lenfoma (FL), DBBHL' dan sonra en yaygın ikinci düşük dereceli B hücreli lenfomadır. Kuzey Amerika'da ve Batı Avrupa'da %20 oranında gözlenmektedir ve bu oran Doğu Avrupa ve Asya genelinden düşüktür. FL hastalarının ortalama tanı alma yaşı 59'dur ve erkeklerde kadınlara oranla 1,7 kat daha fazla FL tanılı hasta bulunmaktadır. Pediatrik hasta popülasyonunda çok nadir görülmekle birlikte yine erkek bireyleri daha çok etkilediği görülmektedir (2).

2.2.2. FOLLİKÜLER LENFOMANIN TUTULUM ALANLARI

Çoğunlukla lenf nodu tutulumu gösterse de gastrointestinal kanalda özellikle duodenum, cilt, tiroid bezleri, tükürük bezleri, meme ve testisler gibi ektranodal bölgelerde de tutulum gösterebilmektedir (14). Primer Duodenal FL'lar dışında, ektranodal gelişim gösterenlerde DBBHL dönüşümü daha hızlı olarak seyretmektedir (2).

2.2.3. FOLLİKÜLER LENFOMANIN ETİYOLOJİSİ

FL etiyojisi için kesin bir bilgi yoktur. Otoimmün hastalıklar ve immün sistemin baskılanması, lenfoma riskinde artışla ilişkilendirilmiştir. Pestisit ve herbisit maruziyetinin, saç spreyi kullanımının da risk artışına sebep olabileceği gözlenmiştir (15). Pestisite maruz kalan bireylerde kanda t(14;18) bulunduran B lenfositlerin arttığı bildirilmiştir (16). Sigara kullanımı, sağlıksız beslenme ve yaşam tarzı da FL gelişimini tetikleyebilecek aktörlerden olabilir (17). Epstein-Barr virüs, insan T-hücre lenfotropik virüs tip I ve nadiren de olsa insan Herpes virüs-8 gibi virüslerin de FL ile ilişkili olduğu saptanmıştır (18).

2.2.4. FOLLİKÜLER LENFOMANIN KLİNİK ÖZELLİKLERİ

FL, yıllar içindeki yavaş ilerlemesi ile yavaş klinik seyirli olarak adlandırılan bir hastalıktır. Genellikle yavaş klinik seyirli olarak karakterize edilmelerine rağmen hastalığın ilerleyişi her zaman yavaş değildir ve hızlı gelişen ve agresif form olan DBBHL dönüşümü olabilmektedir (19). FL genel olarak lenf nodu tutulumu ile ortaya çıkar, ancak dalak, kemik iliği, periferik kan ve lenf nodülü dışı (ektranodal) bölgeler örneğin Waldeyer halkası, sindirim kanalı tutulumları da olabilmektedir. Hastaların çoğu (%40-70) evre III/IV durumunda tanı almaktadır (2). Farklı yayınlarda değişkenlik göstermekle beraber hastaların yalnızca % 15-33 'ü evre I/ II' de tanı almaktadır (20).

Güncelenen WHO sınıflamasında varyant olarak tanımlanan, FL' nin primer ince bağırsak başlangıcı, özellikle duodenuma özgü tipi moleküler ve klinik davranış bakımından diğer ektranodal, nodal ve sistemik benzerlerinden farklıdır (2).

FL'den agresif forma (DBBHL'ye) dönüşüm vakaların %30-40'ında gerçekleşmektedir. DBBHL'ye dönüşüm durumunda FL hastaları genellikle bir yıl içinde hayatlarını

kaybetmektedirler. Diğer taraftan, vakaların %20'sinde tedavi almaksızın kendiliğinden gerileme olduğu rapor edilmiştir (5).

Bütün bu bilgiler ışığında FL'nin klinik özellikleri açısından da heterojen bir hastalık olduğu anlaşılmaktadır.

2.2.5. FOLLİKÜLER LENFOMANIN ÖZELLİKLERİ

2.2.5.1. Folliküler Lenfomanın Morfolojisi

Neoplastik folliküller, reaktif folliküllerden farklı olarak daha monoton hücrelerden meydana gelmiştir. Bir kısmı çevrelerinde naive B hücrelerinin bulunduğu mantle zon alanı bulundurmaz. Reaktif folliküllerde antijene özgü antikor yapan B hücrelerinin hızla çoğalması ve pozitif seçimi aşamalarında mitoz ve apoptoziste artış meydana gelmektedir. Bu nedenle artmış apoptotik hücre artıklarını fagosite eden "tingible body makrofajlar" reaktif germinal merkezlerde artmıştır. FL'da bulunan folliküllerde ise apoptoz karakteristik mutasyon nedeniyle engellendiğinden hücre ölümü azalmakta ve makrofajlar azalmaktadır (14).

FL'da neoplastik follikül merkez B hücreleri immünofenotipik açıdan incelendiğinde, B hücre belirteçleri olan CD19, CD20, CD79a, ifadesi ve germinal merkez B hücrelerinde aktif olan CD10 ve BCL6 ifadesi bulundurulur (21).

Reaktif germinal merkez B hücrelerinde negatif seleksiyon sırasında antijene özgü antikor yapımı başarısız olan follikül merkez hücreleri apoptoz ile yok edildiğinden, apoptozu engelleyen BCL2 geni inaktiftir. Ancak FL'da %90 oranında bulunan T(14;18) sonucu BCL2 geninde transkripsiyonel regülasyon bozukluğu ile neoplastik folliküllerde ifade artışı ortaya çıkmaktadır. Bu şekilde antiapoptotik protein artışı neoplastik hücrelerin yaşam döngüsünü uzatırken, mitoz sayısı ise azalmaktadır. Bu durum FL için lenfomagenezin en önemli sebeplerinden biri olarak bilinmektedir (22).

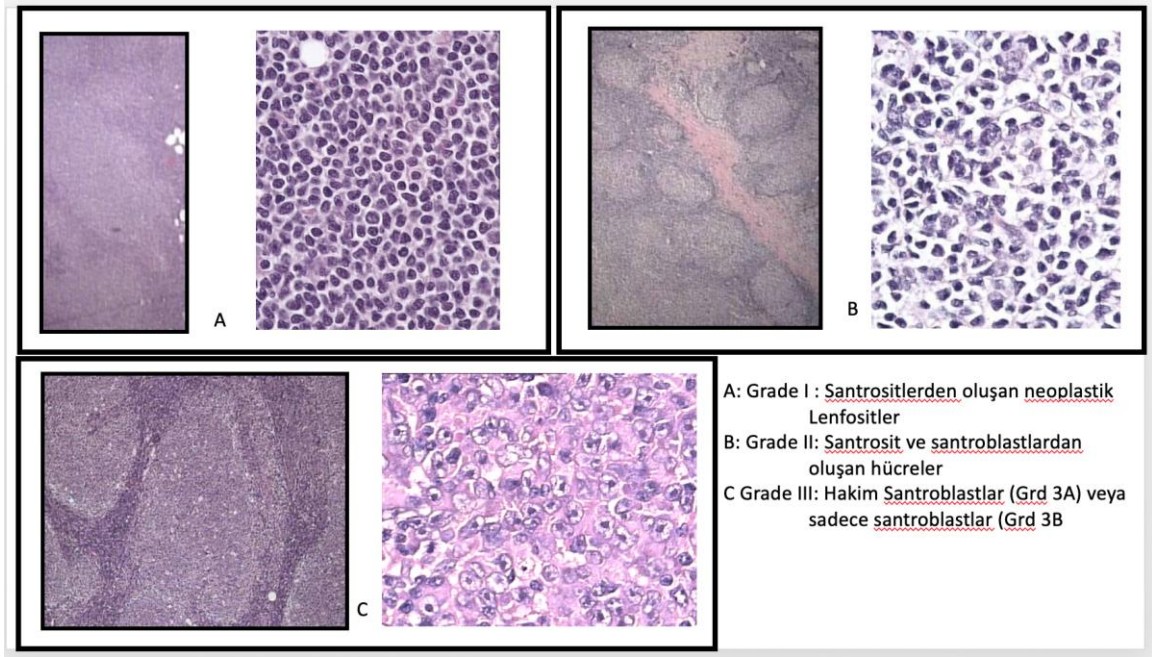
Folliküler lenfomanın en önemli ayırıcı özelliği olan bu translokasyon, grade 1/2 vakaların %10-20'sinde bulunmayabilir. Grade 3 vakaların yarısının bu translokasyon açısından negatif olarak raporlandığı çalışmalar bulunmaktadır (2).

2.2.5.1.1. Folliküler Lenfomada Grade

Tümörün klinik agresifliği, sentroblastların sayılarının artmasıyla doğru orantılı olarak WHO tarafından aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır (23).

- Grade 1 (0-5 sentroblast/ büyük büyütme alanı (40x büyütme oranı, 0,159mm² mikroskopik alan),
- Grade 2 (6-15 sentroblast/ büyük büyütme alanı),
- Grade 3 (15'ten fazla sentroblast/ büyük büyütme alanı),
 - Grade 3A; sentroblastların yanında sentrositler de mevcut,
 - Grade 3B; sadece sentroblastlardan oluşur (Şekil 2.1.).

FL'larda %80-90 oranında vakalar Grade 1 ve 2 şeklindedir. Bu vakalar klinik davranış olarak benzediğinden “düşük dereceli” olarak kabul edilirler ve aynı şekilde tedavi edilirler. Grade 1 ve 2 FL'larda değerlendirenler arasında değişkenlik oranının yüksekliği ve farklı alanlarda farklı grade görülebildiğinden birlikte değerlendirilirler. Grade 3A ve 3B'nin de arasında klinik davranış farklılığı bildirilmektedir (24). Klinik, prognoz açısından olduğu kadar moleküler genetik özellikler açısından da birbirlerinden çok farklı yapıya sahip olduklarını gösteren yayınlar mevcuttur. Bazı çalışmalarda, Grade 3A FL ve Grade 1-2 FL'nin ilerlemesi şeklinde aynı sınıfa girerken, Grade 3B *de novo* DBBHL gibi klinik davranış olduğu belirtilmiştir (25). Ancak yayınlanan bazı klinik çalışmalarda Grade 3A ile 3B alt grupları arasında genel ve hastalısız sağ kalım anlamında önemli farklar olmadığını göstermişlerdir (24,26).



Şekil 2.4. Folliküler lenfomalarda histolojik grade mikroskopik örnekleri (Prof. Dr. Işınso KUZU).

2.2.5.2. Folliküler Lenfomanın Fenotipi

FL'da neoplastik hücreler reaktif folliküllerdeki B lenfositlerde bulunan antijenleri ifade ederler. CD20, CD19, CD79a, CD10 ve BCL6 karakteristik belirteçlerdir. Ancak reaktif ve neoplastik folliküllerin en önemli farklılığı hastalığın patogenezinde tanımlanan t(14;18) anomalisi sonucu ortaya çıkan BCL2 ifade artışıdır. Reaktif ve neoplastik follikülleri ayıran en önemli bulgulardan biri BCL2 ifade artışıdır. BCL2 ifadesi %85-90 oranında, özellikle Grade 1-2 olguda bulunmaktadır. Grade 3 olgularda bu oran %50 altına inmektedir (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. Folliküler lenfomanın immünohistokimyasal belirteçleri

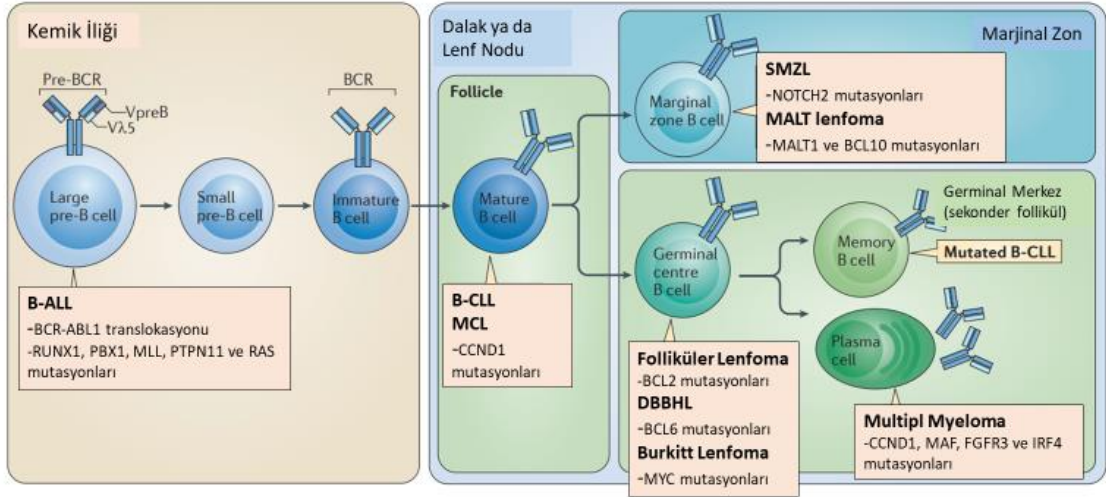
	CD20	CD19	CD79a	CD10	BCL2
Grade 1	+	+	+	+	+(%85-90)
Grade 2	+	+	+	+	+(%85-90)
Grade 3	+	+	+	-/+	-/+(%50)

BCL2 ifadesinin bulunmamasının bazı hastalardaki sebebi gendeki mutasyonların proteinlerde aminoasit değişikliğine yol açması nedeniyle kullanılan antikorların epitopu tanınamasından kaynaklanabilmektedir. Başka follikül merkez belirteçleri, örneğin LM02, GCET1 ve HGAL(GCET2) ayırıcı tanı zorluğu olan vakalarda kullanılabilir. Neoplastik follikül hücreleri arasında mitoz oranı da reaktif follikül merkezlerinden genellikle çok daha düşüktür. Ki67 ile belirlenen proliferasyon indeksi değerlendirilmesi burada önemlidir. Ancak bazı araştırmalarda düşük dereceli (Grade 1-2) FL vakalarının bir kısmında yüksek Ki67 proliferasyonu bildirilmektedir. Bu vakaların düşük proliferasyonlulardan daha agresif olduğu bildirilmiştir (27,28).

2.2.5.3. Folliküler Lenfomanın Moleküler Patogenezi

T(14; 18)(q32; q21) translokasyonu, FL hastalarının yaklaşık %90'ında görüldüğünden FL'nin genetik damgası (hallmark) olarak adlandırılmaktadır (29–31). Bu translokasyon ile İmmunoglobulin ağır zincir (IgH) geni regülatör bölgesi, BCL2 geni regülatör bölgesi yerine geçer. Normalde reaktif germinal merkez B hücrelerinde inaktif olan BCL2 geni transkripsiyonu aktif olan IgH regülatör bölgesi tarafından kontrol edildiğinden anti-apoptotik protein BCL2'nin artmış ifadesine sebep olur (Şekil 2.5.) (32,33).

Bu hatanın B hücre reseptörü IgH geninin repertuarında çeşitliliği ortaya çıkartan IgH lokuslarındaki V (variable), D (diversity) ve J (joining) bölgelerinin kemik iliğinde kök hücre aşamasındaki rekombinasyonunun olduğu sırada meydana geldiği bilinmektedir (34,35). BCL2 ailesi proteinleri mitokondrinin dış membran geçirgenliğini ayarlayarak, sitoplazmaya sitokrom C salınımını yönetir. BCL2 sitokrom C salınımını inhibe eder ve böylece sitokrom C, APAF1, ATP ve Caspase 9'dan oluşan apoptozom protein kompleksinin oluşumunu da engellemiş olur (36).



Şekil 2.5. B hücreli lenfomaların gelişim basamakları (37).

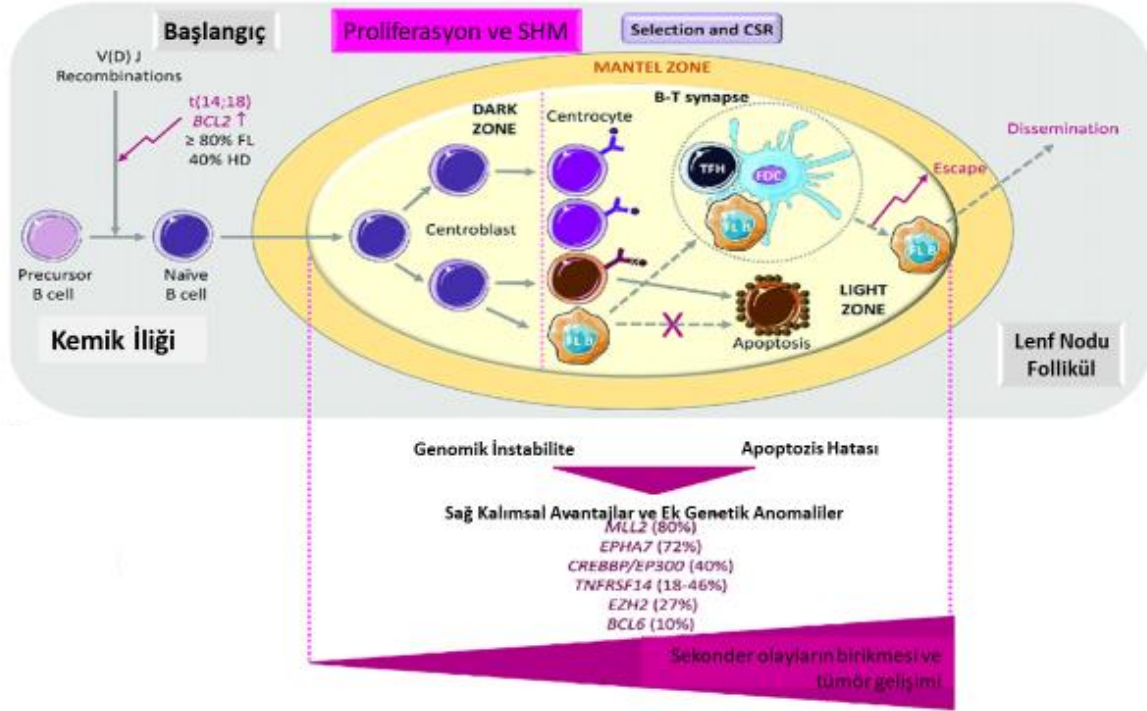
BCL2'nin anti-proliferatif olduğu gibi anti-apoptotik özelliğinin ve t(14;18) translokasyonunun sağlıklı bireylerde de görülebildiği görülmüş olup, bu değişikliğin çok önemli ancak lenfomagenezi tetiklemek için BCL2'nin aşırı ifadesinin tek başına yeterli olmadığı anlaşılmıştır (36,38,39). Normal bireylerdeki germinal merkez B hücreleri, spesifik bir antijen tarafından plazma ya da bellek B hücrelerine dönüşmek üzere seçilmemişler ise apoptozisle yok edilirler. Ancak germinal merkezdeki afinite matürasyonu ve sınıf dönüşüm rekombinasyonu (class switch recombination) esnasında apoptozise yönlendirilmeyen BCL2 ifade eden FL hücreleri, sekonder kromozomal değişiklikler geçirmeye eğilimlidir (Şekil 2.6.) (40–42).

Sitogenetik analizler FL örneklerinde ortalama dört ya da altı genomik değişim bulunduğunu göstermiştir. Bunlardan en sık gözlenenler kromozom 6q delesyonu, trizomi 12, X kromozomu duplikasyonu, der 18 (derivative of chromosome 18) değişiklikleridir (43,44).

Karşılaştırmalı kromozom genomik hibridizasyon (CGH) yöntemleri ile tespit edilen bu değişikliklerden bazıları, tümör progresyonu ve histolojik transformasyonla ilişkili bulunmuştur. 6q 25-27 delesyonu kötü prognozla ilişkilendirilirken, 1q36.22-p36.33 ve 6q21.q24.3 daha kısa sağ kalımla anlamlı bir şekilde ilişkilendirilmiştir (45,46).

FL'de kromozomal boyuttaki değişikliklerin dışında, farklı epigenetik modifikasyonlarda görev alan genlerde de sıklıkla mutasyonlar gözlenmektedir. Bir histon metiltransferaz

(HMT) olan MLL2'deki mutasyonlar FL vakalarının %89'unda gözlenir (47). MLL2, histon 3'ün 4. pozisyonundaki lizinin (H3K4) metilasyonunu katalize eder, bu modifikasyon ile ilgili genlerin transkripsiyonunda artış gözlenir. Bir başka deyişle, MLL2 gen transkripsiyonunun pozitif regülatörüdür. Bu gende meydana gelen mutasyonlar fonksiyon kaybı mutasyonlar olup, transkripsiyon baskılama ile sonuçlanan epigenetik bozukluklara eğilime sebep olmaktadır (48).



Şekil 2.6. Folliküler Lenfoma Patogenezi (49).

FL vakalarında mutasyon görülen bir diğer HMT ise EZH2'dir ve FL vakalarının %10-20'sinde gözlenir (50,51). EZH2, H3K27'nin metilasyonunu katalizler, ancak H3K4'ün aksine, H3K27'nin metilasyonu genellikle transkripsiyonel olarak inaktif genlerle ilişkilidir (52). EZH2'nin SET domaininde kritik bir tirozin rezidüsünde meydana gelen Y641 fonksiyon kazanılmasına sebep olan bir yanlış anlamlı mutasyondur ve trimetilasyon seviyesinde artışa sebep olduğu gösterilmiştir (50). Bu nedenle, EZH2'nin artmış aktivitesi transkripsiyonun baskılanmasında artışa ve gen ifadesinin germinal merkez benzeri profil kazanmasına sebep olmaktadır (53).

CREBBP ve EP300 normal hücrel fonksiyon için kritik olan iki yakın ilişkili histon asetil transferazdır (HAT). Bu iki genin asetilasyonundaki bozukluk sonucu oluşan mutant proteinler, BCL6'nın konstitütif aktivasyonu ve azalmış p53 aktivasyonu ile ilişkilidir (54).

MEF2B ise HAT ve HDAC'lerin promotör bölgelere toplanmasında görevli transkripsiyon faktörünü kodlar (55). Bu gendeki mutasyonlar FL vakalarının %10-20'sinde gözlenir. Bu mutasyonlar yanlış anlamlı mutasyonlar olup, proteinin DNA'ya bağlandığı ve dimerizasyonun sağlandığı MADS-box ve MEF2 domaininde meydana gelir. Bu mutasyonların fonksiyonel getirisi bilinmemekle beraber, CREBBP ve EP300 gibi histon modifikatör proteinlerin, gen transkripsiyonun değişimine yol açarak, MEF2B hedef genlerine toplanmasında dengesizliğe etkisi olabileceği düşünülmektedir (56).

2.2.5.4. Histolojik Transformasyon

Tüm FL hastalarının yaklaşık %40 civarı, yılda ise %2-3 FL hastası agresif forma dönüşmektedir (57–59). Bu dönüşüm genellikle DBBHL'ye olmakla birlikte, çok nadiren de olsa yüksek dereceli B hücreli lenfoma, lenfoblastik lenfoma ya da akut lenfoblastik lösemiye de olabilmektedir (60–62). Transformasyonda neoplastik hücrelerdeki genetik anormaller ve mikroçevrenin rol oynadığı düşünülmektedir. P53 ve CDKN2A gibi tümör baskılayıcı genlerdeki değişiklikler sonucu kayıp ve Myc onkogenindeki amplifikasyonlar transformasyon için hedef genleri oluştururken, folliküller arası bölgelerde folliküler dendritik hücrelerin (FDH) kaybı ve/veya CD4⁺ T hücrelerinin artışı mikroçevresel açıdan transformasyonda önem arz etmektedir (63–65).

Yeni nesil dizileme yöntemleri agresif forma transformasyonda etken olabilecek mutasyonların daha kapsamlı bir tanımının yapılmasını sağlamıştır. Çeşitli sinyal yollarında görev alan PIM1, SOCS1, STAT6, MYD88, TNFAIP3 ve ITPKB, hücre döngüsünde rol alan CCND3, B hücre gelişiminde rol alan EBF1, germinal merkez B hücrelerinin yayılımında görev alan GNA13, S1PR2 ve P2RY8 ve immün sistemden kaçışta görev alan CD58 ve B2M gibi genlerdeki mutasyonlar transformasyon ile ilişkili bulunmuştur (66–68).

2.2.6. TANI VE EVRELEME

FL hastalarının çoğu semptom göstermezler ve genel olarak nodal bir hastalık profiline sahiptirler. Hastaların az bir kısmı primer olarak ektranodal bir profil sergilerler (69,70). NHL'ler ve Hodgkin lenfomanın evrelemesi için yapılan önceki Ann Arbor evreleme sistemine dayanan Lugano sınıflandırmasına göre (Çizelge 2.2. ve 2.3.), lenfadenopatilerde, lenfomatöz bir durumdan şüphe edilmesi halinde, ekzisyonel ve insizyonel biyopsi alınması gerekmektedir. FL'de evrelemenin doğru yapılması, tedavi seçeneklerinin değerlendirilmesi açısından özellikle az sayıdaki erken evre hastalar için kritik önem bulundurulur. FL'nin anatomik evrelemesi için PET-BT (Bilgisayarlı Pozitron EmisyonTomografisi) ve kemik iliği biyopsisi yapılması şarttır (71).

Çizelge 2.2. Ann Arbor Evreleme Sistemi (72).

Evre I	Tek lenf düğümü bölgesi (I) ya da tek ekstralenfatik alan (IE)
Evre II	Diyafiramın tek tarafında 2 ya da daha fazla lenf düğümü bölgesi (II) ya da diyafiramın tek tarafında lokal ekstralenfatik yayılımla birlikte bir ya da daha fazla lenf düğümü bölgesi (IIE)
Evre III	Diyafiramın her iki tarafında lenf düğümü bölgeleri (III), lokal ekstralenfatik yayılım eşlik ediyorsa IIIE, dalak tutulumu varsa IIIS, lokal ekstralenfatik tutulumla dalak tutulumu eşlik ediyorsa IIISE
Evre IV	Eşlik eden lenf düğümü tutulumu olsun ya da olmasın bir ya da daha fazla ekstralenfatik organın yaygın tutulumu

Çizelge 2.3. Lugano Evreleme Kriterleri (72).

Evre I	Tek lenfatik bölge (I) ya da lokalize olmuş tek ekstra lenfatik organ ya da bölge (IE) katılımı
Evre II	Diyafiramın tek tarafında iki ya da daha fazla lenfatik bölge katılımı (II) ya da lokalize olmuş tek ekstra lenfatik organ katılımı ya da bölgesi ve diyafiramın tek tarafında bir ya da daha fazla lenfatik bölge katılımı
Evre III	Diyafiramın her iki tarafında da lenfatik bölge katılımı
Evre IV	Lenfatik katılımı birlikte ya da tek başına bir ya da daha fazla yaygın ya da diffüz ekstra lenfatik organ katılımı

2.2.7. FOLLİKÜLER LENFOMA PROGNOZU

FL biyolojik olarak heterojen bir hastalıktır ve prognoz bireyler arasında farklılık gösterir. Düşük dereceli (grade 1-2) folliküler lenfomalar, yüksek dereceli (grade 3) folliküler lenfomalardan çok daha agresif klinik davranış gösterirler. Yavaş klinik seyirli olarak bilinen folliküler lenfomaların düşük dereceli grubunda genel olarak daha yavaş bir klinik ilerleme tablosu mevcutken, yüksek dereceli grup genellikle diffüz büyük B hücreli lenfomaya benzer şekilde agresif bir klinik davranış sergilemektedir. Bu klinik seyir heterojenitesinin altında yatan sebepler arasında Şekil 2.6 da belirtilen ek mutasyonların kazanılması bulunmaktadır. Bu süreç ve yüksek grade li FL ya ilerleme farklı tedavi seçeneklerinin değerlendirilmesi açısından önem taşımaktadır.

Prognoz tahmini için klinik ve laboratuvar verileri esastır. FL'nin prognozunda Histolojik Grade'den bağımsız olarak değerlendirilen uluslararası FLIPI (Follicular Lymphoma International Prognostic Index) algoritması temel alınmaktadır. Bu algoritmanın oluşturulmasında 4000'den fazla tedavi almış FL hastasından elde edilen veriler kullanılmıştır (73). Bu sistemde göz önüne alınan prognostik faktörler; hastalıktaki nodal bölge sayısı, laktat dehidrojenaz (LDH) seviyesi, yaş, hastalığın evresi ve hemoglobulin düzeyidir. Bu sisteme göre 0-1 faktör düşük risk, 2 faktör orta dereceli risk, 3'ten fazla faktör yüksek risk grubunu işaret etmektedir. Rituximab'ın keşfinden sonra FLIPI algoritması güncellenerek FLIPI-2 olarak adlandırılmıştır (Çizelge 2.4.). Yeni sistemde, kemik iliği tutulumu ve β -mikroglobulin (B2M) seviyeleri de risk faktörleri arasına dahil edilmiştir (74) Bu tez çalışmasında FLIPI-1 algoritması baz alınarak prognostik açıdan risk durumu değerlendirilmiştir.

Çizelge 2.4. FLIPI ve FLIPI-2 Risk Tablosu (73,75).

Parametre	FLIPI-1	FLIPI-2
Lenf nodu	>4 lenf nodu bölgesi	>6 cm
Yaş	>60	>60
Serum belirteç	Normalden yüksek LDH	Yüksek β -mikroglobulin
Evre	Ann Arbor III-IV	Kemik iliği tutulumu
Hemoglobin	<12 g/dL	<12 g/dL
Beş yıllık sağkalım (%)		
Düşük risk (0-1)	91	79
Orta risk (2)	78	51
Yüksek risk (3-5)	53	20

2.2.8. FOLLİKÜLER LENFOMADA TEDAVİ

Hastalık seyri ile ilgili bilinen bu heterojeniteye benzer olarak tedavi seçenekleri de çeşitli alternatifler barındırmaktadır. Bunlar; yüksek dozda kemoterapi içeren agresif tedavi, kök hücre transplantasyonu, immünoterapi gibi yöntemlerdir. Bu yöntemlerin dışında hastanın tedavi almaksızın takiplerle kontrol altında tutulduğu “izle ve bekle” bir diğer klinik yaklaşım yöntemlerindedir. Anti CD-20 monoklonal antikoru ile immünoterapi tedavisinin başlangıcından önce, ortalama genel sağ kalım FL hastalarında 8 ila 10 yıl arasında değişirken, Anti CD-20 immünoterapi ve yeni nesil özelleşmiş ajanların kullanılmaya başlanmasıyla bu süre önemli ölçüde uzamıştır (Şekil 2.7.) (76).



Şekil 2.7. Folliküler Lenfoma Tedavi Seçenekleri (77).

FL için tedavi erken evre ve ileri evre için olmak üzere ikiye ayrılmıştır:

Erken evrede tedavi: FL hastalarının yalnızca %15-30'u erken evrede tanı almaktadır (78,79). FDG-PET ileri evreleri ayırmak için yardımcı olmaktadır. Grade 1, 2, 3 ya da 3A vakalarında gerekli bölgelere 12 parça halinde 24 Gy radyoterapi uygulanmaktadır (79). Radyoterapi ile ortalama 19 yıl genel sağ kalım, 10 yıllık genel sağ kalım oranı ise %60-80'dir (80). Son yapılan çalışmalara göre, 5 yıl hatasız ilerleme (failure free survival) evre I'de %74 iken evre II'de %48'dir (81). Tedaviye rituximab ya da kemoterapi eklenmesi

durumunda ilerlemesiz sağ kalım artarken, genel sağ kalım bu durumdan etkilenmez. Hastanın içinde bulunabileceği farklı şartlardan ya da tümörlü bölgenin lokalizasyonunun radyasyon tedavisine elverişsiz olmasından bu tedavinin uygulanamayacak olduğu durumlarda, hastanın takip edilmesi makul bir seçenektir. Erken evredeki bazı hastalar tedavisiz 19 yıl yaşamaktadırlar (82). Bulky erken evre hastalık, ileri evrelerdeki hastaların aldığı gibi düzenli immünokemoterapötik tedavi almalıdır ya da radyasyonla birlikte ya da yalnızca immünoterapi almalıdır (78). Grade 3B vaka gruplarında varılmış olan konsensusa göre DBBHL'deki gibi immünokemoterapi ile R-CHOP 6 döngüde uygulanır. Alternatif olarak erken evre için radyoterapiyi takiben 3-4 döngü R-CHOP uygulanabilir.

İleri evrede tedavi: Hastaların büyük çoğunluğu ileri evrede tanı almaktadır. Semptom göstermeyen FL hemen tedavi gerektirmeyebilir. Ancak, semptomatik nodal hastalık, semptomatik ekstranodal hastalık ya da sitopeni gibi belirtiler gözlendiğinde tedavi gerekliliği ortaya çıkar. Bu yaklaşım takip edilen hastalar ve tedavi alan hastaları karşılaştıran randomize bir prospektif çalışma ile desteklenmiştir. En büyük çalışmalardan biri, chlorambucil tedavisi ile takibi karşılaştırmıştır (83). Ortalama 16 yıllık bir takip sürecinde, iki yaklaşım arasında genel sağ kalım ve sebep-spesifik sağ kalımda bir farklılık gözlenmemiştir. Benzer sonuçlar diğer prospektif iki yaklaşımı karşılaştıran çalışmalarda da elde edilmiştir (84). Rituximab; FL'nin tedavisinde büyük bir dönüm noktası yaşatmıştır. Bunun ardındaki asıl sebep anti-CD20 antikor temelli bir tedavi olmasıdır (85). Rituximab'ın faydaları rituximablı ya da yalnızca kemoterapi alan hastaların karşılaştırıldığı birçok çalışmada gösterilmiştir (19,86). Bu çalışmaların hepsi rituximab ile kemoterapi kombinasyonunun genel sağ kalım ve yanıt oranındaki artış olduğunu göstermiştir (75). Rituximab'a dirençli FL hastalarında diğer çeşitli anti-CD20 antikorlarına karşı yanıt değerlendirilmiştir. Bu antikorlardan Obinutuzumab daha önce tedavi almamış FL hastalarında yapılan faz III çalışmasında, kemoterapinin obinutuzumab veya rituximab ile kombine olarak denenmiştir (87). GALLİUM çalışması olarak da bilinen bu çalışmada, obinutuzumab ve rituximab 2 yıl idame tedavisi uygulanmıştır. Tedavi yanıtları iki grupta da benzer iken, ilerlemesiz sağ kalım obinutuzumab alan hastalarda daha yüksek çıkmıştır. Genel sağ kalımda ise hiçbir farklılık gözlenmemiştir. Ancak yan etkiler obinutuzumab alanlarda daha fazla gözlenmiştir.

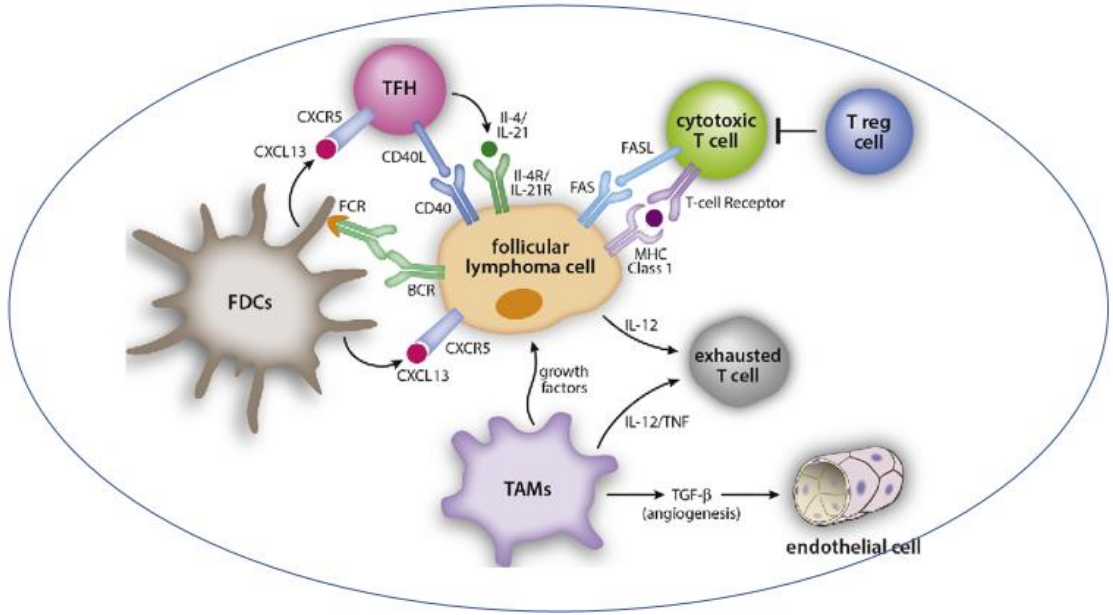
Bu iki grubun yanı sıra nüks hasta grupları için de birçok tedavi seçeneği bulunmaktadır. Bunlar; yalnız başına rituximab, rituximab-kemoterapi kombinasyonu, radyoimmünoterapi ve belli hastalar için kök hücre transplantasyonudur. Nüks eden FL hastalarında çeşitli hümanize edilmiş anti-CD20 monoklonal antikoru çalışmaları mevcuttur. Rituximab'ın yüksek dozda kullanıldığı refrakter (tedaviye dirençli) hastalardaki tedavi yanıt oranı %55, ilerlemesiz sağ kalım orta değeri 11,9 aydır (88). Nüks ve refrakter FL hastalarında obinutuzumab ile kemoterapi kombinasyonu çalışmalarında %93-98 tedavi yanıt oranı gösterilmiştir (89). Nüks hastalarında CHOP ve R-CHOP ile tedavi kıyaslandığında, R-CHOP grubunda tedavi yanıtının ve ilerlemesiz sağ kalımın yaklaşık 12 ay arttığı gözlenmiştir (90). Rituximab ile immünomodülatör kombinasyonunun, etkisi incelenmiştir. Bunların içinde en etkili olan kombinasyonun lenalidomid ile rituximab kombinasyonu olduğu anlaşılmıştır. Bu kombinasyondaki yanıt oranı, tek başına rituximab'da %53 iken, kombinasyonda %70'tir (91). Anti-CD20 radyoimmünoterapi ajanlar nüks ve refrakter FL hastalarında kullanılan başka bir seçenektir (92). Tedavi yanıt oranı %60-80'dir. Ortalama ilerlemesiz sağ kalım yaklaşık 12 ay, radyoimmünokonjugatlar çok yaygın bir kullanıma sahip değildir.

FL radyasyon terapisine oldukça yanıt veren bir hastalıktır. Düşük doz radyoterapi, tek bir hastalık bölgesiyle ilgili semptomları olan hastalarda, hastayı rahatlatmak için (palliation) kullanılabilir. %57 oranında yanıt oranı vardır (93).

FL'de otolog ya da allojenik hematopoetik hücre transplantasyonu metotları tartışmalıdır ve pek çok çalışmanın konusudur (94). Çok sayıda faz II çalışması, yüksek doz terapi ve otolog HCT'nin iyi performans gösterdiğini ve kemoterapiye duyarlı nüks hastalarının ve performans durumu iyi olan hastaların %40'ının ilerlemesiz sağ kalım ve genel sağ kalımda artış olduğu saptanmıştır(95,96).

2.2.9. FOLLİKÜLER LENFOMA VE MİKROÇEVRE

Folliküler lenfoma, B hücrelerinin aşırı proliferasyonu ile karakterize edilmesine karşın, son yıllarda lenfomagenez senaryosunun diğer oyuncularının mikroçevre elemanları olduğu ortaya çıkmıştır. Burkitt lenfoma gibi bazı lenfomalarda tümör hücrelerinin yoğun proliferasyonu sonucunda lenf nodu mimarisi değişirken ya da Hodgkin lenfomada olduğu gibi reaktif hücreler toplanırken, FL'da, folliküler dendritik hücreler ve yardımcı folliküler T hücreleri (TFH) ile desteklenen germinal merkeze benzer bir folliküler organizasyona girer. Ancak FL lenf nodlarının görüntüsü reaktif olanlardan farklıdır. FL mikroçevresi yardımcı T17 hücrelerinin aksine Treg hücrelerince zengindir (Şekil 2.8.) (97). T lenfositlerinin dışında FL, monosit polarizasyonunu immün sistemi baskılayıcı fenotipe dolaylı olarak yönlendirir (98).



Şekil 2.8. Folliküler Lenfoma Mikroçevresi (97).

Mikroçevrenin önemi, araştırmacıların FL hücre hatlarını mikroçevresel faktörler olmaksızın çoğaltamaması ile ortaya çıkmıştır (57,99). Mikroçevrenin öneminin anlaşılmasından sonra FL gibi klinik seyri heterojen olan bir hastalık grubunda, mikroçevrenin prognoz üzerinde kritik etkileri hakkında veriler elde edilmeye başlanmıştır.

Lenfoma/Lösemi Moleküler Profillemeye Projesi (LLMPP)'nin önemli bir çalışmasından elde edilen sonuçlara göre; T hücre ve makrofajlarla ilgili genlerin ifadesindeki değişiklikler iyi prognozla ilişkili bulunurken, makrofaj ya da dendritik hücrelerle ilgili genlerin ifadesindeki değişiklikler genlerin transkriptlerin kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (100).

Tümör mikroçevresi, hücre ölümüne direnç, hücre istilası, proliferasyonun sürdürülmesi, immün sistem baskılanması, kendini yenileme ve anjiyogenez gibi yollarla lenfomagenез ve lenfoma progresyonuna katkıda bulunur (101).

FL mikroçevresi tümör gelişimini üç farklı mekanizma ile teşvik eder. Bunlardan ilki, FL B hücre reseptörünün stereotipik mannozlanan rezidüsünün, dendritik hücreler ve makrofajlardan salınan lektinler ile etkileşimi sonrasında B hücre reseptörünün aktive edilmesiyle gerçekleşir (102,103). İkinci mekanizma, folliküler helper T hücreleri tarafından salınan interlökin-4 (IL-4) gibi tümörü teşvik eden sitokinlerin parakrin sekresyonudur. Sonuncu mekanizmada ise, FL mikroçevresi, sitotoksik CD8⁺ T hücrelerinin proliferasyonu baskılama ve etkili immün sinaps oluşturma yeteneklerini baskılama suretiyle immün sistemden kaçışta büyük rol oynamaktadır (104).

De Jong ve arkadaşları, lenfomalarda, hastalığın şiddeti, tedaviye yanıt ve hastalığın klinik seyrine etkileyen faktörler arasında, neoplastik B hücrelerinin mikroçevre ile olan kompleks etkileşimin büyük rolü olduğunu gösterdiler (105).

FL ve DBBHL'de son zamanlarda yapılan gen ifadesi çalışmalarından elde edilen veriler, neoplastik özellik taşımayan lenfositlerin, prognostik anlamda önemli unsurlar olduğunu göstermiştir (106).

FL mikroçevresinde infiltre T hücreleri ve makrofajlar tarafından ifade edilen proteinler seyrin en önemli belirleyicilerindedir. Özellikle regülatör T hücreleri (Treg) ve tümör ilişkili makrofajlar (TİM), yapılan birçok çalışmadan elde edilen bilgilere göre FL'nin prognozuna ve tedaviye yanıtına etki etmektedirler (107).

Folliküler lenfoma gelişiminde birçok sinyal iletim yolağının rolü bulunmaktadır. Bunlardan biri olan Transforming Growth Factor Beta (TGFβ) yolağı, folliküler lenfoma mikroçevresindeki birçok hücre tipinin fonksiyonunun düzenlenmesinde görev almaktadır.

TGFB özellikle tümör mikroçevresinde bulunan NK(Natural Killer) hücreleri, CD4⁺ T ve CD8⁺ T hücreleri, makrofajlar, nötrofiller, dendritik hücreler, mast hücreleri ve B hücrelerinin fonksiyonlarını etkiler (108,109). TGFB'nın yüksek seviyeleri B hücrelerinin apoptozisine, dendritik hücrelerin ve NK hücrelerinin olgunlaşmasının baskılanmasına neden olur (110,111).

TGFB, granzim A, granzim B, perforin, FAS ligandı ve interferon γ gibi birlikte T hücre aracılı tümör hücre sitotoksitesine sebep olan unsurların ekspresyonunu da baskılar (112). Granzim B ve interferon γ 'nın ekspresyonu direkt olarak TGFB yolağında yer alan Smad2/Smad3 ve ATF1 transkripsiyon faktörleriyle bağlantılıdır (113).

TGFB monositlerin makrofajlara farklılaşmasında da rol alır (114). Ayrıca makrofajların M1 formundan M2 formuna polarize olmalarını teşvik ederler ve bu şekilde monosit aracılı hücre ölümünün baskılanmasını engellerler (115). TGFB, makrofajlarda, Makrofaj Enflamatuvar Protein 1 α ve 2 (MIP1 α ve MIP2), CXCL1 kemokini, Granülosit-Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör sitokini (GM-CSF) ve IL-1 β , IL-8 ve IL-10 gibi interlökinlerin ekspresyonunu baskılar (116). Bunun sonucunda makrofajların aktivitesi baskılanmış olur (117). Bunların hepsi göz önüne alındığında, TGFB'nın makrofajların farklılaşmasını, aktivasyonunu, gen ekspresyon profilini ve dış uyaranlara karşı yanıtını düzenlediğini ve böylece tümör gelişimini direkt olarak etkilediği anlaşılmaktadır.

TGFB, makrofajlar üzerindeki etkisi aracılığı ile CD4⁺ T hücre proliferasyonunu baskılar (118). Tümör mikroçevresindeki regülatör T hücreleri TGFB sitokinini salgılar ve CD8⁺ T hücrelerinin baskılanmasına yol açar (119). TGFB, T hücrelerinin farklılaşmasını ve fonksiyonlarını baskılar, proliferasyon olmalarını ve etkinleşmelerini engeller (120). Ayrıca, TGFB mürin periferik kan ve pankreas kanserinde naif CD4⁺ T hücrelerinin regülatör T hücrelerine farklılaşmasını sağlar (121).

Belli tümör hücrelerinde, örneğin kolorektal kanser ve prostat kanserinde, TGFB'nın yükselmiş seviyeleri kötü prognozla ve nüksle ilişkilendirilmiştir (122). Bu durum tümör mikroçevresindeki malign olmayan hücrelerde TGFB'nın artmasıyla ilişkilendirilmiştir. (123).

2.2.9.1. REGÜLATÖR T HÜCRELERİ (TREG)

T hücrelerinin heterojen bir alt grubunu oluşturan regülatör T hücreleri (Treg) zararlı immün yanıtları inhibe ederler. Regülatör T hücreleri lenfoma hücreleri ile mikroçevre arasındaki ilişkiyi düzenleyen önemli modülatörlerdir. Treg hücreleri insan ve farelerde, periferel CD4⁺ T hücrelerinin %5-10'unu oluşturmaktadırlar (124–126). FOXP3 regülatör T hücrelerinin tek belirteçidir. Treg neoplastik T hücre popülasyonunun büyümesini engellerler (127).

Daha önceleri baskılayıcı T hücreler olarak adlandırılan bu hücreler iki temel gruba ayrılmaktadır;

Timus kökenli doğal Treg; sürekli olarak interlökin 2 reseptörünün (IL-2R) α zinciri olan CD25 ifade eden CD4⁺ T hücrelerdir (137,138). Bu hücreler, temas (kontakt) ve sitokin bağımlı olarak aktiveleştirilirler.

Doğal regülatör T hücreleri (nTreg) timusta gelişirler ve yaşamlarının üçüncü gününden itibaren periferel dolaşıma başlarlar (128). nTreg, T hücre havuzunda mevcut otoreaktif T hücrelerini baskırlar ve bu şekilde periferel tolerans ve immün homeostasisi sürdürürler. 1995'te Sakaguchi bu yeni nTreg popülasyonunda yüksek seviyelerde CD25 (IL-2R α zinciri) ifade eden güçlü baskılama özelliğine sahip CD4⁺ T hücrelerini göstermişlerdir. Bu CD4⁺ CD25⁺ T hücreleri *in vitro* ortamda anejiktir. Ayrıca bu hücreler konvansiyonel CD4⁺ CD25⁻ efektör T hücrelerinin *in vitro* ve *in vivo* proliferasyonu ve sitokin sekresyonunu inhibe etme yetisine sahiptirler (129).

Thornton ve arkadaşları, nTreg'in *in vitro* baskılayıcı özellikleri için net bir karakterizasyon yapmışlardır; antijen spesifik olmayan nTreg özelliklerini kullanabilmek için etkinleştirilmeye ve bu baskılama hücre temasına ihtiyaç duyarlar (130).

CD25 aktivasyon sonrasında konvansiyonel CD4⁺ T hücrelerinde de ifade edildiğinden faydalı bir belirteç değildir. nTreg için diğer belirteç adayları CTLA-4 (sitotoksik T lenfosit antijen 4) ve GITR (glukokortikoid uyarımlı tümör nekrozis faktör reseptör)'dür.

2003'te spesifik nTreg belirteci tanımlanmıştır; transkripsiyon faktörü FOXP3'ün nTreg gelişimi ve aktivitesi için gerekli olduğu gösterilmiştir. FOXP3 geninde bir mutasyon

barındıran Scurfy farelerde, fonksiyonel olmayan nTregden dolayı ölümcül otoimmün enflamasyon gözlenmiştir (131).

2.2.9.1.1. Uyarılmış Regülatör T Hücreleri (iTreg)

Bu hücreler IL-10'un etkisindeki toleranslı çevrede antijen stimülasyonu ile teşvik edilen adaptif regülatör T hücreleridir ve Tr1 hücreleri olarak adlandırılmışlardır. Çeşitli gruplar Tr1 hücrelerinin immatür dendritik hücreler tarafından uyarıldığını göstermiştir. Bu Tr1-tip Treg hücreleri FOXP3 ifade etmezler ve IL-10 ve TGFβ1 sekresyonu ile baskılayıcı aktivite gösterirler (59,101).

Chen ve arkadaşları, TGFβ1 varlığındaki TCR-uyarısının, konvansiyonel CD4⁺ CD25⁻ T hücrelerinde FOXP3'ün ifadesini arttırdığını gösterdiler. İn vitro testlerde TGFβ1 ile indüklenmiş FOXP3⁺ T hücrelerinin anerjik ve inhibe edici olduğu gözlenmiştir. Ayrıca FOXP3⁺ iTreg CD4⁺ T hücrelerinin antijen-spesifik çoğalmalarını in vivo olarak göstermişlerdir(132).

Sonraki çalışmalar TGFβ1 aracılı FOXP3 ifade artışındaki moleküler yolağı daha iyi açıklamışlardır ve NFAT (aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörü) ve Smad3 transkripsiyon faktörlerinin iTregde FOXP3 uyarımı için kritik olduğunu kanıtladılar (133).

Treg hücrelerinin davranışsal özellikleri çok fazla çalışmanın konusu olmasına rağmen. Treg aracılığı ile inhibisyonun altında yatan mekanizmalar hakkında çok net bilgiler elde edilememiştir.

Treg hücreleri ile baskılama için hücre kontağı gerektiğinden, hücre yüzeyinde baskılama yeteneğine sahip ifade olan moleküller (CTLA-4, membran bağımlı TGFβ, GITR gibi) bu süreçte önemli rol oynamaktadırlar (134,135).

Son zamanlarda tanımlanan B7 ailesi üyesi B7-H1'nin reseptörü PD-1 ile etkileşiminin, TCR sinyalini olumsuz olarak etkilediği ve bu şekilde TCR-aracılı proliferasyon ve sitokin üretimini azalttığı gösterilmiştir. Tümöre sıızan CD4⁺ CD25⁻ T hücrelerinde PD-1'in ifade edildiğini, CD4⁺ CD25⁺ T hücrelerde ise PD-1 ifadesinin olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca B7-H1'in, B hücreli NHL'lerde tümör içinde aktive olmuş Treg hücrelerinde indüklenebildiği gözlenmiştir. Bu sonuçlar, B7-H1 ve PD-1 arasındaki etkileşimin, tümör içindeki Treg

hücrelerinin aracılığıyla inhibisyonda rolü olabileceğini göstermektedir. Aslında sonuçlar, B7-H1 ve PD-1 etkileşiminin engellenmesinin, B hücreli NHL'lerde tümör bölgesindeki CD4⁺ CD25⁻ T hücrelerinin, Treg hücre aracılı baskılamayı azalttığını göstermektedir (136).

Treg hücreleri immün sistem üzerinde baskılayıcı etkilerinin yanı sıra, diğer T hücrelerini enfeksiyöz tolerans olarak adlandırılan olayla baskılayıcı hücreler olmak üzere eğitebilirler. Enfeksiyöz tolerans olayı ilk olarak kısa süreli monoklonal antikorlar ile muamele edilen sıçanlarda uzun süreli transplantasyon sağ kalımını keşfeden araştırmacılar tarafından tanımlanmıştır. Toleranslı sıçanlardan transfer edilen T hücrelerinin naif sıçanlarda benzer bir tolerans durumuna sebep olduğunu gösterdiler (137).

FOXP3⁺ Treg ve lenfoma arasındaki ilişki hala net bir şekilde açıklanamamıştır. Bazı çalışmalarda Treg sayısının artışı iyi prognozla ilişkilendirilirken, bazı çalışmalarda tam tersi sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca farklı lenfoma tiplerinde ve hematolojik olmayan tümörlerden de farklı sonuçlar ortaya çıktığı bilinmektedir (138). Bu tartışmaya açık sonuçların olası sebepleri şunlar olabilir;

1. Treg değerlendirilmesinde kullanılan yöntemlerin ve bu yöntemlerin heterojenitesi
2. Anti-FOXP3 antikor spesifitesindeki farklılıklar
3. Alt ve üst sınır değerleri farklılığı
4. Analiz için tümör alanının seçimi (139,140).

Muhtemel biyolojik açıklamaya göre; Treg CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinin aktivitelerini IL-10 ve TGFβ sekresyonu ile düzenlemektedirler. Böylece, bir taraftan neoplastik klonların immün sistemden kaçışına yardımcı olurlarken, diğer taraftan tümöre sızan diğer hücreler tarafından indüklenen pro-enflamatuvar uyarıdan yararlanmasını engellemektedirler (141,142).

Lenfomada 4 farklı şekilde davranış gösteren Treg bulunmaktadır;

1. Supresör Treg
2. Malign Treg
3. Direkt tümör öldürücü Treg
4. Yetersiz (incompetent) Treg

Treg supresör ya da malign olarak hareket ederlerse, anti-tümör toksisitesi baskılanır, böylece Treg'in sayısındaki düşüş, iyi prognozla ilişkilendirilir. Bu durumun aksine, Treg tümör öldürücü ya da yetersiz davranış sergilerlerse anti-tümör toksisitesi artar ve böylece Treg sayısındaki yükseliş iyi prognozla ilişkilendirilir (143).

2.2.9.2. TÜMÖR İLİŞKİLİ MAKROFAJLAR

Makrofajlar fenotipik ve fonksiyonel olarak çok fazla çeşitlilik gösteren immün sistem hücre popülasyonudur. Bütün dokularda yaygın bir şekilde bulunan makrofajların majör olarak enfeksiyonlara karşı doğal immün yanıt oluşturulmasında rol oynarlar. Bununla birlikte doku tamir ve gelişim mekanizmaları ile homeostaziste önemli görevleri vardır (144).

Genel olarak makrofajların kökeni kemik iliği olarak bilinmektedir. Ancak akciğer alveolar ve peritoneal makrofajları, Kupffer hücreleri, epidermal Langerhans hücreleri ve beyin mikroglia hücreleri gibi primitif yolk sac öncüllerinden köken alan makrofajlar da mevcuttur (118).

Tümör ilişkili makrofajların (TİM), tümör hücreleri ya da kanser mikroçevresindeki monositik öncüllerin malign olmayan hücreler tarafından salınan kemotaktik sinyaller aracılığı ile toplanmasını sağlayan kan hücrelerinden köken aldığı düşünülmektedir (145,146). Ancak bu konuda henüz açıklığa kavuşmamış noktalar bulunmaktadır. Farelerde yapılan çalışmalarda, beyindeki mikroglia gibi belli dokularda bulunan makrofajların fetal ya da embriyonik gelişim esnasındaki öncüllerden meydana geldiği gösterilmiştir (147,148). Tümör ilişkili makrofajlar yüzey antijeni olarak spesifik olarak CD163 ifade ederler. CD68 ifadeleri de vardır ancak daha temiz sonuç elde edildiğinden immünohistokimyasal olarak daha çok CD163 antikörleri tercih edilmektedir.

Tümör dokularında toplanan dolaşımdaki TİM'lere farklılaşan öncüller, klasik enflamatuvar monositler ve monosit ilişkili myeloid kökenli baskılayıcı hücreleri (M-MDSCs) içerirler.

Transkripsiyon faktörü Smad3'ün ifadesinin baskılanması, M-MDSC'lerin matür TİM'lere farklılaşmasındaki temel faktördür (149). Farelerde enflamatuvar monositlerin TİM'lere farklılaşması RBPJ'e (Notch sinyal yolağındaki bir transkripsiyonel regülatör) bağlıdır. TİM'lerde bu proteindeki genetik delesyon tümör yükünü azaltmaktadır.

TİM'lerin farklı fonksiyonlara sahip iki alt grubu bulunmaktadır. Bunlardan ilki 'M1-tipi' adı verilen ve tümör karşıtı davranış gösteren makrofajlardır. Diğeri ise 'M2-tipi' olarak adlandırılan tümör gelişimine katkıda bulunan makrofajlardır (150). Tümör hücrelerinden, T lenfosit, B lenfositlerden ve stromal hücrelerden kaynaklanan sinyaller TİM fonksiyonunu ve çeşitliliğini etkilemektedir. Klasik olarak aktive olmuş 'M1' makrofajlar ekstrasellüler mekanizmalar ile tümör hücrelerini öldürürler (145,146).

Makrofaj ve T hücre miktarının prognozla ilişkisi son zamanlarda çok fazla çalışmanın olduğu popüler bir alanı oluşturmaktadır. Ancak TİM'ler ile ilgili çalışmalara bakıldığında birbiriyle çelişen farklı sonuçların ortaya çıktığı gözlenmektedir (151,152). 1970'lerde yapılan çalışmalar makrofajların bakteriyel metabolitler ile etkinleştiğini ve tümör hücrelerini yok etmek için sitokinlere ihtiyaç duyduklarını göstermiştir (145,153). Ayrıca TİM'lerin tümör gelişimini ve metastazı pozitif yönde etkilediği gösterildi (118). Böylece makrofajların kanser ile iki farklı yönde ilişki içerisinde olduğu anlaşılmış oldu. Yeni oluşan tümörlerde, makrofajların T hücreler ve interferonlar tarafından yönetilen immüno-regülasyonun erken eliminasyon evresine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (154).

TİM'ler, tümör mikroçevresinde rol oynamalarının yanı sıra tümör hücrelerinin içsel özelliklerini de etkilerler. Örneğin, TİM'ler meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu uyaran EGF gibi büyüme faktörlerini üretirler (145). Ayrıca makrofajların metastatik hücrelere avantaj sağlayan özellikleri de vardır. IL-1 gibi faktörler üreterek tümör hücrelerinin uzak yerlerde birikmesine olanak sağlarlar (118).

TİM'ler anjiyogenez ve lenfomagenezi de teşvik ederler (155). Bütün bu özellikler tümör gelişimi ve ilerlemesine katkı sağlar. TİM'ler çift yönlü etkileşimle Treg'lerin immüno-süpresif aktivitelerini de artırırlar. Makrofajlar tümörlerde immüno-süpresif sitokinler IL-10 ve TGF β sitokinlerini üreterek bu sürece destek olurlar (156). Kanser ilişkili enflamasyonda (CRI) çok önemli bir role sahip TİM'lerin tümör gelişimindeki etkisi, enflamatuvar sitokinler gibi diğer enflamatuvar hücrelerin katkılarının tanımlanmasıyla anlaşılmıştır (118).

TGFβ'nin keşfinden sonra makrofajlarla olan ilişkisi araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Başlangıçta, TGFβ bir immüno-baskılayıcı ve makrofajları inhibe eden ajan olarak düşünülmüştür (157). Daha sonra, makrofaj farklılaşma aşamasına bağlı olarak monosit/makrofaj fonksiyonundaki iki yönlü etkisi keşfedilmiştir (158).

Klasik Hodgkin lenfoma (CHL) hastalarında tümördeki TİM'lerin gen imzası ve yüksek CD68⁺ hücre sayısı, bu karakteristik özelliklere sahip olmayan hastalarla karşılaştırıldığında kemoterapi sonrasında kısalmış sağkalımla ilişkilendirilmiştir. Böylece TİM'ler, risk değerlendirmesinde bir biyobelirteç olarak düşünölmeye başlanmıştır. Yüksek CD68 veya CD163 ifadesi birbirlerinden bağımsız olarak sağ kalımla ilgili olarak olumsuz belirteçler olarak tanımlanmıştır. Bu durum da yüksek evreli CHL hastalarda kemoterapi sonrası TİM'lerin prognostik öneme sahip olduğunu göstermiştir (118).

Daha önce de yüksek TİM (CD68⁺) içeren tümörlerin, çoklu ajan terapisi almış FL hastalarında olumsuz sonuçlar doğurduğu gösterilmiştir (102,103). Bu prognostik ilişki R-CHOP tedavisi ile tersine döndürölmüştür (159).

Bir başka çalışmada, CD163⁺ TİM'lerin, R-CHOP tedavisi almış FL hastalarında iyi prognozun işareti olduğu, R-CVP (rituximab, cyclophosphamide, vincristine, prednisone) tedavisi almış hastalarda kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (160). Bu sonuçlar TİM miktarının FL hastalarında prognoz tahmininde rol oynadığını gösterirken, bu prognostik etkinin tedaviye bağılı olduğunu göstermektedir.

Rituximab tedavisinden önceki dönemde, birçok immünohistokimya çalışmasında, yüksek makrofaj sayısı kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (161,162).

Ancak makrofaj aracılı tümör gelişiminin altında yatan mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır. Daha önceleri makrofajların sitokin ve kemokin üreterek malign B hücrelerine sağ kalım sinyalleri sağladıkları düşünülmekteydi (161). Uyarılma tipine göre makrofajlar M1 ya da M2 tiplerine farklılaşmaktadır, bu iki tipin immün yanıtındaki rolleri farklıdır. Ancak M2 tip makrofajların FL'deki rolleri net olarak anlaşılamamıştır, tedaviyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (61).

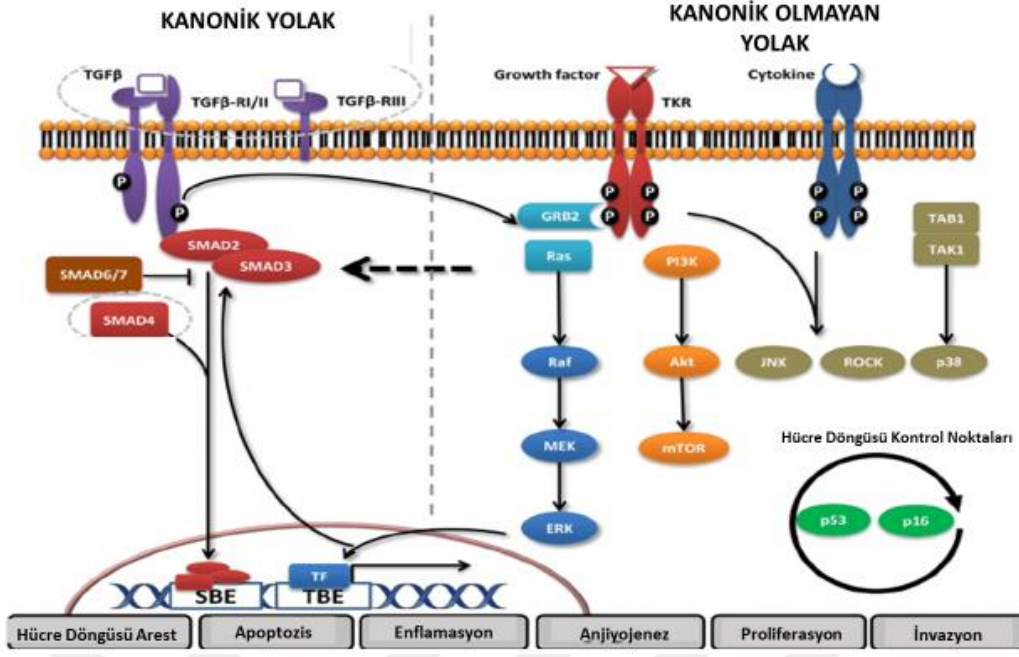
Gen ifade profili (GİP) çalışmaları, binlerce genin hücresel fonksiyonlarının büyük bir resmini ortaya koymak için aynı anda ifadelerinin ölçülmesidir. Doğru istatistik ve biyoinformatik analizler ile, gen ifade profili çalışmalarından lenfoma biyolojisi hakkında önemli bilgiler elde edilmektedir. Dave ve arkadaşları (100), dönüm noktası olan çalışmalarında, 1974 ile 2001 yılları arasında tedavi almamış FL tanısı almış 191 hastanın tümör biyopsilerini kullanarak GİP çalışması gerçekleştirmişlerdir. Bunlardan 95'i deneme grubunu, 96'sı da çalışma grubunu oluşturmuştur. Biyopsi sonrasında hastalar çeşitli standart tedaviler görmüşlerdir, bunlar; antrasiklin ya da pürin analogu içeren kemoterapi gibi kemoterapi çeşitleri, olog kök hücre nakli ya da tedavisiz takip politikası ile izlenmiştir (6).

2.3. TGFB/ SMAD YOLAĞI

Hücre proliferasyonu, farklılaşması ve migrasyonundaki etkileri ile gelişimsel programları ve hücre davranışını kontrol eden TGF β (Transforming Growth Factor Beta) süper ailesi genel olarak iki ayrı fonksiyonel gruba ayrılmıştır (163–165):

1. TGF β 'lar, Activinler, Nodallar ve bazı büyüme ve farklılaşma faktörlerini (GDF) içeren transforme edici büyüme faktörü (TGF) beta-benzeri grup
2. BMP, GDF ve Anti Mullerian Hormon (AMH)'den oluşan Kemik Morfogenetik Proteinleri (BMP)-benzeri grup.

TGF β süper ailesi üyeleri proliferasyon, hücre farklılaşması, ölüm, hücre iskeleti organizasyonu, adezyon ve migrasyon gibi temel hücresel süreçleri düzenlerken; şartlara bağlı olarak kimi zaman da kanser progresyonunda önemli rol oynamaktadırlar. TGF β yolağında iki farklı yoldan sinyal iletimi gerçekleşir. Kanonik ve kanonik olmayan yollar adlandırılan bu yollardan kanonik yolda sinyal iletimi Smadlar üzerinden gerçekleşirken kanonik olmayan yolda ise PI3K (Phosphoinositide 3-kinase), MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) gibi yollar üzerinden sinyal iletilir (Şekil 2.9.) (166).



Şekil 2.9. TGFβ Kanonik ve Kanonik Olmayan Yolak (167).

2.3.1. TGFβ/ SMAD YOLAĞI ELEMANLARI

2.3.1.1. Ligandlar

Proteinin düzgün katlanması için gereken geniş bir amino-terminal prodomainine ve aktif ligandı oluşturan yüksek derecede korunmuş bir karboksi terminale sahip olan TGFβ süper ailesi ligandları, ilk önce bir prekürsör protein olarak sentezlenir (168).

Prekürsörün Furin ve diğer proprotein konvertazlar gibi enzimler tarafından parçlanması (cleavage) matür dimerik ligandı meydana getirir. Bazı üyelerin yapılarının yüksek çözünürlükte incelenmesi sonucunda, matür ligandların, yüksek derecede korunmuş altı sistein arasındaki hücre içi üç disülfid bağının oluşumundan meydana gelen “sistein düğümü/ilmeği” olarak adlandırılan bir yapı tarafından yönlendirildiği gösterilmiştir. Çoğu aile üyesinde korunmuş olan yedinci sistein, biyolojik olarak aktif molekülü oluşturmak için kovalent disülfid bağı ile dimerizasyonu sağlar (169).

2.3.1.2. Ekstrasellüler Ligand Bağlayıcı Proteinler

Ligandın reseptörlere ulaşması çok sayıda ekstrasellüler bağlanma faktörü tarafından kontrol edilmektedir. Başlık 2.3.1.1.'de bahsedildiği gibi, matür TGF β süper ailesi ligandları büyük bir prekürsörün parçalanması ile ortaya çıkar. Ancak bazı durumlarda TGF β ligandı prekürsörünün parçalanmış halini içeren LAP (latency-associated peptide) ya da LTBPs (latent TGF β -binding proteins) adı verilen büyük bir kompleks halinde hücrelerden sekrete edilirler. Bu kompleksler ekstrasellüler matriksteki TGF β 'ya el koyarak (sequester) ya da matür ligandı serbest bırakmak için integrin reseptörleriyle etkileşim aracılığıyla ligand aktivitesini kontrol ederler (168).

2.3.1.3. Heterodimerik Serin/Treonin Kinaz Reseptör Sinyal Kompleksi

TGF β süper ailesi üyelerinin sinyalleri tip I ve tip II transmembran serin/treonin kinaz reseptörlerinden oluşan heterodimerik kompleksler aracılığıyla iletilir (170–172).

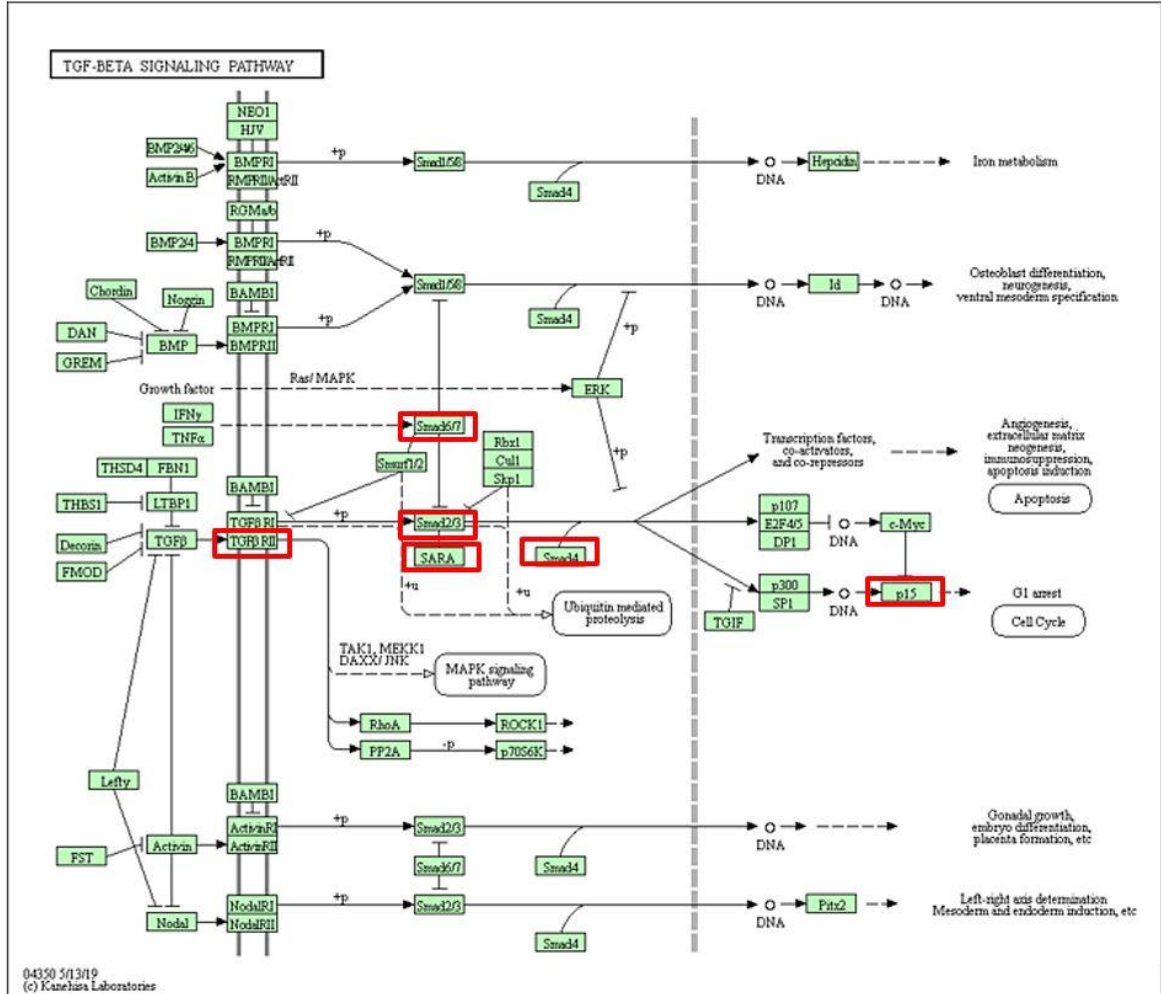
Omurgalılarda 5 tip II reseptörü ve 7 tip I reseptörü vardır. Ancak bütün TGF β süper ailesi için bu reseptörlerin sinyal iletimi için farklı kombinasyonlarla çift oluşturdukları bilinmektedir.

Kısaca, TGF β sadece tip I reseptör TGF β R1 (diğer adları ALK5 ve T β RI) ve tip II reseptör TGF β R2'ye bağlanır. Activin, Nodal ve BMPler tip II Activin reseptörleri 2A (ACVR2A ve ACVR2B)'yi paylaşırlar. Activin ve Nodal, tip I reseptörleri ACVR1 (ALK2), ACVR1B (ALK4) ve ACVR1C (ALK7)'i paylaşırlarken, BMPR1A (ALK3) ve BMPR1B (ALK6) reseptörleri BMPler ve Anti-Muellerian hormon (AMH) için primer reseptör olarak hareket ederler. BMPR2 bir başka BMP tip II reseptörü iken AMHR2 ise AMH için tip II reseptörüdür. Activin reseptör-benzeri 1 (ACVRL1 ya da ALK1) de BMP9 ve BMP10 tip I reseptörüdür, bu ancak yüksek TGF β konsantrasyonlarına bağlı olarak olabilir (173).

Örneğin: ACVR2A ve ACVR2B diğer adlarıyla Activin tip II reseptörleri Activin yanıtlarını oluşturmak için tip I reseptör ACVR1B ile ya da BMP sinyallerinin iletimi için ACVR1, BMPRIA ya da BMPRIB tip I reseptörleri ile kompleks oluştururlar (174).

Aktif reseptör kompleksinin oluşumu, aktif halde bulunan tip II reseptör kinazın, GlySer(GS) domainini fosforile etmesine imkan tanır. GlySer (GS) domaini kinazın hemen üst kısmında bulunan tip I reseptör bölgesidir ve tip I reseptör kinaz aktivitesini etkinleştirir. 7 farklı tip I reseptör olmasına rağmen, TGF β -benzeri ya da BMP-benzeri Smadlardan hangisinin sinyal iletimini sağlama yeteneklerine göre temel iki gruba ayrılırlar (175).

TGF β sinyal yolağını gösterir KEGG haritası Şekil 2.10.'de görüldüğü gibidir.



Şekil 2.10. TGF β sinyal yolağını gösterir KEGG haritası (176).

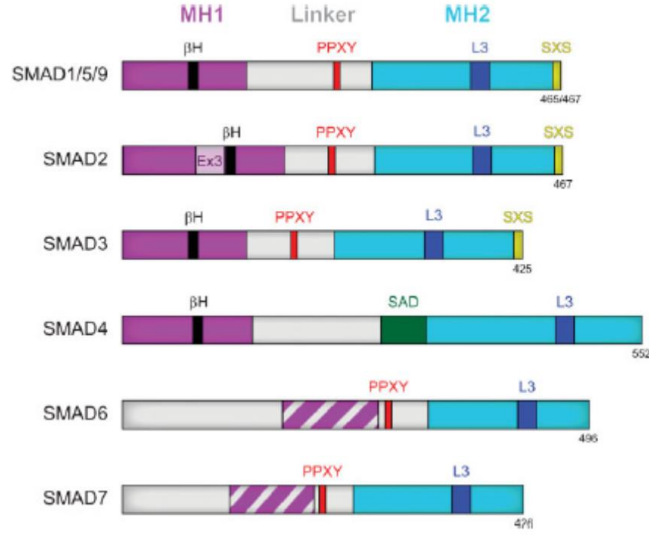
2.3.1.4. Smadlar

Diğer çoğu sinyal kaskadının aksine TGF β yolağı, Smadlar olarak bilinen hücre içi mediyatörler aracılığıyla, ekstrasellüler sinyalleri direkt olarak hücre yüzey transmembran reseptörlerinden nükleusa iletirler. Smad ailesi yüksek derecede korunmuş ve solucanlar ve sineklerdeki homologları olan SMA ve MAD ailelerinden isimlerini almışlardır (177,178).

Omurgalıların çoğunda sekiz Smad varken, *Caenorhabditis* cinsinde altı, *Drosophila*'da ise 4 Smad vardır (179).

Omurgalılarda Smad1, Smad2, Smad3, Smad5, and Smad9 (genelde Smad8 olarak bilinir). Sineklerde Mad ve Smox, solucanlarda SMA-2, SMA-3, DAF-8 ve DAF-14. Bu Smadlar tip I reseptörleri ile ilişkilidir ve aktive olmuş tip I reseptörleri tarafından C-terminal ucundaki (S)SXS motifindeki iki serin rezidüsü fosforile edilir. Bu durum ortak mediyatör Smad4 (common mediator smad, Co-Smad) ile heterodimerik bir kompleks oluşmasına imkan tanır. Ardından Smadlar nükleusta birikirler ve gen ifadesini değiştirmek için transkripsiyonel yanıtlar ortaya çıkarırlar. R-Smadlar tip I reseptör tercihine göre iki alt gruba ayrılabilirler; BMP tarafından aktive edilen Smadlar (Smad1, Smad5, Smad9) ve TGFB tarafından aktive edilen Smadlar (Smad2, Smad3) (169).

R-Smadlar ve Co-Smadlar benzer yapısal mimariye sahiptirler. Korunmuş bir Mad Homology 1 (MH1), MH2 ve bir bileştirici linker domainine sahiptirler (Şekil 2.11.). Smadlardaki bütün domainler çok çeşitli protein partnerleri ile ilişki içerisindedirler, ancak MH1 domaini DNA'ya bağlanmayı sağlayan bir β -hairpin yapısı da içerir. MH2 domaini Smad oligomerizasyonunu sağlar ve özellikle uygun tip I reseptörü ile spesifik DNA bağlama partnerinin anahtar etkileşimlerini sağlayarak sinyal spesifitesinin sağlanmasında önemlidir (169).



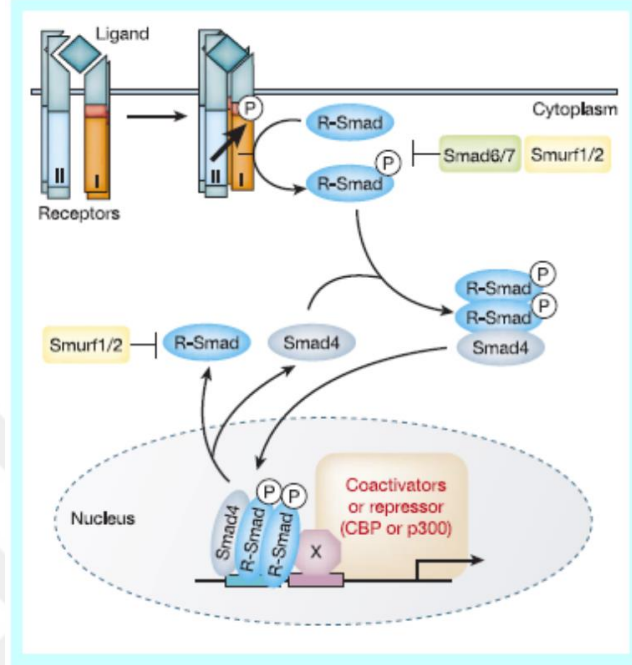
Şekil 2.11. Smad aile domain yapısı (169).

MH1 ve MH2 domainlerinin her ikisi de sekans spesifik transkripsiyon faktörleriyle etkileşime geçebilirken, R-Smadların C terminali ilgili koaktivatörler CREB-binding protein (CBP) ya da p300 ile etkileşime girerler (163,164,180). Smad2 dışındaki Smadların MH1 domaini DNA'ya bağlanabilirken, MH2 domainleri ise Smad oligomerizasyonu ve Smad-reseptör interaksiyonunu sağlar (166). Ortadaki linker domaini ise hedeflenmiş fosforilasyon için serin aminoasitinden ve prolin rezidülerinden zengindir. Bunlar ubiquitin ligazlar gibi çeşitli regülatör proteinler ile etkileşimi artırır ve bu şekilde diğer sinyal yolları ile iletişimde önemli rol oynarlar.

Smadların üçüncü grubunu İnhibitör Smadlar (I-Smadlar) oluştururlar. Bunlar Smad6 ve Smad7'dir. Sineklerde Dad ve solucanlarda TAG-68'dir. I-Smadlarda MH1 domaini çeşitlilik gösterir. Tip I reseptörü ile ilişkiyi kuran MH2 domaini ise korunmuştur. Farklı TGFβeta süper ailesi üyeleri tarafından transkripsiyonel olarak indüklenen I-Smadlar, C-terminal SXS fosforilasyon motifi bulundurmazlar ve böylece yolağın indüklenebilir inhibitörleri olarak hareket ederler (169).

Smad proteinleri sitoplazma ve nükleus arasında sürekli mekik dokurlar. Nükleer pordan giriş çıkışlar nükleoporinler sayesinde gerçekleşir. Ancak reseptörler tarafından indüklenmiş oldukları oligomerik aşamada, Smad proteinleri nükleer içeriye giriş ve çıkış faktörlerine ihtiyaç duyarlar (181–183).

Nükleusta aktive edilmiş Smad4-R-Smad kompleksindeki R-Smad proteinleri partner olarak DNA'ya bağlanan diğer transkripsiyon faktörlerine bağlanırlar ve bu şekilde hedef gen tanınmasını ve transkripsiyonel regülasyonunu sağlarlar (Şekil 2.12.) (184–186).



Şekil 2.12. TGFβ reseptörü ve Smad aktivasyonunun mekanizması (171).

2.3.2. TGFβ/SMAD YOLAĞININ REGÜLASYON MEKANİZMALARI

2.3.2.1. TGFβ RESEPTÖR KOMPLEKS AKTİVİTE REGÜLASYONU

TGFβ yolağı membrandan nükleusa kadar birçok aşamada çok sıkı bir kontrol altındadır. Smadlar aracılığı ile etkili TGFβ sinyalizasyonu için TGFβ ligandlarının endozomlarda reseptör internalizasyonunu indüklemesi gerekmektedir (187,188). Aktive olmuş TGFβ reseptör kompleksi iki farklı yolla internalize olur. Sinyalizasyonu kolaylaştırmak için ZFYVE9 (SARA) ya da Hgs(Hrs) ve ZFYVE16 (Endofin) gibi proteinleri içeren erken endozomlara klatrinle örtülü çukurlarla internalizasyon olabilirken, diğer bir yol da reseptörlerin içlerinde ubiquitinasyon ve degradasyon için lizozoma yönlendirildiği Caveolin-1 pozitif lipitleri aracılığıyla taşınmasıdır (189–191). Hangi rotanın izleneceği hakkında yeterince bilgi olmamakla birlikte, I-Smadların ve E3 ubiquitin ligazların HECT domain sınıflarının reseptör degradasyonunda anahtar rol oynadıkları bilinmektedir (52).

Inhibitör Smadlar olan Smad6 ve Smad7 R-Smadlarla yarışarak tip I reseptöre bağlanırlar ve fosforilasyonu engelleyerek negatif regülasyonu sağlarlar (163,180,189). I-Smadlar ayrıca C2-WW-HECT (Homologous of the E6 AP Carboxy Terminus) domain E3 ubiquitin ligazlar Smurf1 (Smad-ubiquitination-regulatory factor 1) ve Smurf2 (Smad-ubiquitination-regulatory factor 2) yi tip I reseptöre toplayarak reseptör kompleksinin degradasyonunda anahtar göreve yaparlar (192).

2.3.2.2. SMAD SEVİYELERİNİN REGÜLASYONU

Gelişim sırasında farklı şekillerde kontrol edilmelerine rağmen, çoğu hücre tipinde R-Smadlar ve Smad4 ifadesi mevcutken, inhibitör Smadlar Smad6 ve Smad7 ifadeleri hücre dışı sinyallerle kontrol edilmektedir. Smad6 ve Smad7 ifadelerinin BMP ve TGF β tarafından indüklenmesi ligand bağımlı sinyalizasyon için bir oto-inhibitör geribildirim mekanizmasıdır (104,173).

Smadların seviyeleri posttranslasyonel olarak ubiquitin-proteozom aracılı yıkım ile kontrol edilir. HECT, Smurf1 ve Smurf2, R-Smadlarla etkileşime geçerek ve onları degradasyona yönlendirmek suretiyle TGF β sinyalizasyonuna zıt bir şekilde çalışırlar (193). Smurf1, Smad1 ve Smad5 ile etkileşime girer ve bu şekilde BMP yanıtlarını etkiler (194). Ancak Smurf2 daha geniş bir kapsamda farklı R-Smadlar ile etkileşerek BMP ve TGF β /activin sinyalizasyonuna müdahil olurlar. Yine de *Xenopus* embriyo çalışmaları Smurf1 ve Smurf2'nin ana hedefinin BMP yolağı olduğunu göstermiştir (195).

Smadlar çok sayıda post-translasyonel modifikasyona uğrarlar. Bu modifikasyonların geri dönüşümlü olması Smad-bağımlı sinyal olaylarının kuvvetini ve süresinin kontrol edilmesinde çok büyük rol oynar. Tip I reseptörler tarafından R-Smadların SXS motiflerinden fosforilasyonu kaskadı başlatır, PPM1A ve SCP'ler (Small C-Terminal Phosphatases) gibi çeşitli fosfatazlar sitoplazmada ya da nükleusta Smadları aynı yerden defosforile ederek Smad aktivitesini sonlandırırlar (196).

Ring-finger sınıfından bazı E3 ligazlar da Smadların ya da Smad partnerlerinin degradasyonunu düzenleyebilirler. Rnf111(Arkadia), Nodal sinyalini kolaylaştırmak için Smad7 ubiquitinasyonunu ve degradasyonunu indüklerken, SCF/ROC kompleksi Smad3 dönüşümünü düzenler. U-Box-bağımlı protein STUB1 (CHIP) ise TGF β ve BMP tarafından

düzenlenen R-Smadların hepsini modüle edebilir (189,190,192). Ayrıca APC (Anaphase promoting complex), sinyali artırma amacı ile transkripsiyonel inhibitör Skil'in ubiquitin-bağımlı degradasyonunu indüklemek için Smad3'ü adaptör olarak kullanır (197).

R-Smadların aksine Smad4 ubiquitinasyonla degradasyona uğramaz. Bunun yerine sumoylasyonla stabilitesi artırılır. Ancak, bazı tümör ilişkili mutasyonlar Smad4'ün ubiquitinasyonuna ve/veya stabilitesinin azalmasına sebep olmaktadır (198).

Smadlar ubiquitinasyon dışında birçok posttranslasyonel modifikasyona uğrarlar. Bunlar, asetilasyon, ADP-ribozilasyonu ve linker domain fosforilasyonudur (196). R-Smadlar, Smad7 gibi asetilasyona uğrarlar. Smad2 ve Smad3'ün MH1 ve MH2 domaininde asetilasyonu Smad'ın çekirdeksel fonksiyonlarını güçlendirerek TGF β sinyalini güçlendiriyor gibi görünürken, Smad7'nin lizin rezidülerinden asetilasyonu ve aynı zamanda E3 ubiquitin ligazlar tarafından proteozomal degradasyon için birlikte hareket ederek Smad7'nin stabilitesini artırır ve aynı zamanda TGF β sinyalini inhibe ederler (199). Smad3 ve Smad4 ayrıca PARP1 tarafından poli-ADP-ribozilasyonuna uğrarlar. Bu modifikasyon Smad-DNA bağlanmasına engel olur ve böylece transkripsiyonu azaltır (200).

2.3.2.3. SMAD HEDEF GENLERİNİN REGÜLASYONU

Smad kompleksleri gen ifade paternlerini düzenlemek için spesifik promotorları hedef alırlar. Co-Smad ve R-Smadlar DNA'ya direkt bağlanabilirlerken, Smad2'nin en yaygın görülen splay varyantı bunu gerçekleştiremez. Bu varyantta DNA'ya bağlanmada küçük bir β -hairpin araya girer (201). Smad DNA bağlanması düşük afiniteye gerçekleşir. SBE'ler (Smad-Binding-Elements) düşük spesifiteye sahipken aynı zamanda GC bölgelerinden, tekrar eden GTCT ya da komplementer dizide AGAC dizilerinden zengindir (202). Smadlar bu zayıf DNA bağlanma motiflerine sahipken, genellikle uygun hedef genlerine toplanması için Foxh1 gibi DNA'ya yüksek afiniteyle bağlanan spesifik proteinlerle direkt etkileşime geçmek zorundadırlar (203,204).

TGF β ve BMP-benzeri Smadlar için farklı transkripsiyon faktörü sınıflarından çok çeşitli partnerler tanımlanmıştır (171,179). Smadlar spesifik transkripsiyon faktörleriyle birlikte DNA'ya bağlanır bağlanmaz, temel kromatin yeniden modelleme kompleksleri, histon modifiye edici asetiltransferazlar gibi koaktivatörler ya da histon deasetilazlar, Ski/Skil

korepresörleri koregülatörleri transkripsiyonun başlatılması ya da baskılanması için toplarlar (169). Çoğu dokuya özel olan bu transkripsiyonel partnerler ve koregülatörler, Smad sinyalizasyonunun sonucunun belirlenmesinde temel bir role sahiptirler. Bu şekilde Smadların farklı hücrelerde farklı transkripsiyonel yanıtlara nasıl sebep olduğunun da bir açıklaması yapılmış olmaktadır.

2.3.2.4. SMAD AKTİVASYONUNUN REGÜLASYONU

Ligandların indüklemesi sonucunda aktive olmuş tip I reseptörleri ile R-Smadların etkileşimi, tip I reseptör kinazlar tarafından C-terminalindeki SSXS motifinin distalindeki iki serin direkt fosforilasyonu ile sonuçlanır. Bu etkileşim hem reseptördeki hem de Smadlardaki sekanslar tarafından spesifikleşir. Tip I reseptör kinaz domaininin dokuz amino asitlik L45 loop'u Smad bağlanma özgülüğünün, reseptör sinyalizasyonunun ana belirleyicisidir. Ayrıca R-Smadların MH2 domainindeki L3 loop'u ile direkt etkileşime girerler. L3 loop'unun downstreamindeki diziler reseptör- bağlanma özgülüğüne katkıda bulunur. Tip I reseptörün GS dizisinin tip II reseptör tarafından serinlerden fosforilasyonu, L3 loop'unun downstreamindeki sekanslar ile bir ara yüz oluşturur ve Smad kenetlenmesini sürdürür ve Smad- interaksiyon özgülüğüne katkıda bulunur (205,206).

Hücre iskeleti proteinleri de Smadların lokalizasyonunda ve sinyalizasyonunda görev alır. Fosforile olmayan Smad2 ve Smad3 mikrotübül filamentlerine bağlanır ve TGF β ayrışmalarına olmalarına sebep olur. Mikrotübüllerin nocodazole ile parçalanması bu ayrışmayı artırır ve Smad2 fosforilasyonu ve aktivitesini güçlendirir (207). Smadlar ayrıca aktinle çapraz bağ yapan hücre içi sinyal proteinleri için iskele (scaffold) olan filaminler ile de etkileşirler. Ektopik olarak filamin ifadesi tarafından kurtulabilecek olan filamin ifadesi hatalı olan hücrelerde TGF β sinyalizasyonu ve Smad2 fosforilasyonu bozulur (208).

2.3.3. TGFB/SMAD YOLAĞI VE KANSER

TGF β yolağı, embriyogenez ve doku homeostazisi gibi farklı biyolojik süreçlerde hücre tipine ve hangi sinyal iletim yolları ile etkileşimde olduğuna bağlı olarak çeşitli davranış biçimleri sergileyebilmektedir (209).

Çok yönlü bir etki mekanizmasına sahip bu sitokin, normal hücrelerde hücre çoğalmasını baskılayıp, farklılaşmaya teşvik ederken, kanserin ileri evrelerinde tümör gelişimini ve

metastazı tetikleyebilmektedir. Kimi zaman bir tümör baskılayıcı gibi hareket ederken kimi zaman da bir onkogen gibi davranış sergilemektedir.

TGF β yanıtını hücrede belirleyen üç farklı tipte değişken vardır. Bunlardan ilki; TGF β sinyal iletim sistemindeki hücre dışı ve hücre içi ligand, reseptör, regülatör ve inhibitörlerin oluşturduğu kompozisyonudur. Farklı ligandların, reseptörlerin ve regülatörlerin yoğunluğu ve etkinlikleri nükleustaki TGF β sinyalinin biçimini ve şiddetini etkilemektedir. Ayrıca Smad proteinlerinin fonksiyonlarının düzenlenmesi ve kanonik olmayan yolların aktivasyonu, şekillenmesine yardımcı olmaktadır (210–212).

İkinci faktör ise; Smad proteinleri ile birlikte çalışan diğer transkripsiyon faktörleridir. Bu faktörlerin rolü FoxH1 (Forkhead Box H1)'in tanımlanması ile açıklığa kavuşmuştur. FoxH1, Smad proteinlerinin mezoderm farklılaşmasında görev alan genlerin promotörlerindeki ARE (Activin Response Element) bölgelerini tanımasını sağlayan bir faktördür (213). Hücre tipine özgü transkripsiyon faktörleri, TGF β ve BMP tarafından etkinleştirilmiş Smad proteinlerini miyoblastlarda, pro B hücrelerinde, miyeloid öncüllerinde ve eritroid öncüllerindeki spesifik bölgelere yönlendirirler (184,185). Farklılaşmış hücrelerde, çeşitli transkripsiyon faktörleri, Smad proteinlerini hedef genlerin farklı alt gruplarına yönlendirirler (214). Bütün bu Smad partnerlerine ulaşılabilirlik hangi genin hedefleneceğini ve bu genlerin aktif olup olmayacağını belirler.

Sonuncu faktör ise; epigenetik manzaradır. DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, nükleozom pozisyonlaması, kodlama yapmayan RNA'lar ve diğer bileşenler kromatin yapısını şekillendirerek epigenetik yapıyı oluşturur. Bu şekilde gen ifadeleri düzenlenerek, ifadesi olacak genler ve ifadesi baskılanacak genler belirlenir. Örneğin; embriyonik kök hücrelerde kendilerini yenilemeye uygun koşullar altında, pluripotent karakterlerini güçlendirecek genler açık tutularak TGF β sinyallerinin transkripsiyonel aktivasyonuna imkan tanırken farklılaşma genleri baskılanmış vaziyette tutulur (184,185,215).

Tümör hücreleri TGF β 'nın büyümeyi baskılayıcı etkisinden, TGF β sinyal yolağı elemanlarında meydana gelen mutasyonlarla ya da tümör karşıtı yanıtı bozarak kaçarlar. Kanser hücreleri, tümör baskılayıcı yanıtın oluşmasında aksaklık olduğu durumda TGF β ile etkileşimde olan çeşitli sinyal yollarını kendi yararlarına çalışır hale getirirler. Bu durumun altında yatan mekanizmanın araştırıldığı çeşitli çalışmalarda, sinyal yolağı

elemanlarının, hücre tipinin, hücre fonksiyon özgülüğünün ve ayrıca stromal hücrelerin dahil olmasının bu biyolojik karmaşıklığa sebep olduğu ortaya çıkarılmıştır (216).

TGF β 'nın transkripsiyon üzerindeki etkisi hedeflenen gen ve hücresel yapıya bağlı olarak pozitif ya da negatif olabilmektedir. Örneğin; TGF β , ID1(inhibitör of differantiation) ifadesini memeli epitel hücrelerinde baskılarken, metastatik meme kanseri hücrelerinde teşvik eder (217,218). Bazı TGF β hedef genleri tüm hücre tiplerinde ortaktır, Smad7 ve SKIL (SKI-Like onkogen) gibi negatif geribildirim regülatörleri buna örnek olarak verilebilir.

TGF β antiproliferatif etkisini, hücre siklusunu G1 evresinde durdurularak gerçekleştirir. Bunun için de iki farklı yol izler;

1. CDK inhibitörlerinin ifadesini uyarmak
2. C-Myc ifadesini baskılamak.

TGF β , epitel hücrelerinde, CDK4 ya da CDK6'nın siklin D ile kompleks oluşturmasını engelleyen CDK inhibitörü p15INK4b ifadesini, CDK2 ile siklin E ya da A'nın kompleks oluşturmasını engelleyen p21CIP1 ifadesini teşvik eder. Smad3-Smad4 kompleksi FoxO transkripsiyon faktörleri ile, p15INK4b'yi kodlayan CDKN2B ve p21CIP1'yi kodlayan CDKN1A genlerinin promotorlarını hedeflemek için birlikte hareket etmektedir (216).

c-Myc, hücre büyümesi ve bölünmesinin anahtar transkripsiyonel uyarılarından biridir. Keratinositler ve memeli epitel hücrelerinde, c-Myc'in ifadesinin baskılanması, TGF β tarafından indüklenen Smad3-Smad4 kompleksi ve p107, E2F4 ya da E2F5 transkripsiyon faktörleri ve CCAAT/enhansır bağlanma proteini β (C/EBP β) aracılığı ile gerçekleşir (216,217). C/EBP β , bu kompleks tarafından Myc ifadesinin baskılanmasında gerekliyken, Smad3-Smad4-FoxO kompleksi tarafından p15INK4b ifadesinin etkinleştirilmesi için de gereklidir. Böylelikle C/EBP β , TGF β 'ya karşı yanıtta p15INK4b ve c-Myc kodlayan genlerin ifadelerinin arasında bir denge sağlar (216) .

Smad-bağımsız TGF β 'nın ilişkili olduğu yollar, TGF β 'ya antiproliferatif yanıtla ilişkilendirilmiştir (166). Örneğin; TGF β , p70S6K'nın PP2A tarafından defosforilasyonunu sağlar, böylece hücre siklusunu durdurur (219).

TGF β ayrıca apoptozisi de tetikleyebilir. TGF β , hepatosit ve B lenfositlerde, Bcl-2 ailesi üyesi Bim'in proapoptotik etkisini güçlendiren MKP2 fosfatazı kodlayan geninin Smad3 bağımlı transkripsiyonu aracılığıyla apoptozisi başlatır (220). Ayrıca, TGF β sağ kalımla ilgili Survivin proteininin ifadesini baskılar, aynı zamanda kolon kanser hücrelerinde Akt aktivitesini de baskılar ve apoptozise yönlendirir (221). Bunlarla birlikte, TGF β /Smad yolağının, transkripsiyon faktörleri Rb ve E2F4 ile birlikte prostat epitel hücrelerinde Survivin ifadesini baskıladığı gösterilmiştir (222).

Smad-bağımlı yanıtların dışında, TGF β , TRAF6-TAK1-JNK/p38 yolağı ile de bazı hücre tiplerinde apoptozisi tetikler. E3 ligaz TRAF6'nın, TGF β tarafından indüklenen apoptoziste temel bir rol oynadığı anlaşılmıştır (223).

Tümör gelişimi süresince, tümör hücreleri, TGF β 'nin tümör baskılayıcı yanıtlarından çeşitli kurtulma yollarını kullanmaktadırlar. Bazı durumlarda tümör hücreleri, TGF β /Smad sinyal iletim yolağının elemanlarının kodladığı genlerde ortaya çıkan somatik mutasyonlar ya da epigenetik susturma ile tümör karşıtı aktiviteden kaçabilmektedirler. Yolağın temel elemanlarının mutasyonlarla etkisiz hale gelmesi kolorektal kanserde, pankreas, over, gastrik kanserlerde ve baş-boyun kanserlerinde meydana gelirken, meme, prostat kanserleri, gliomalar, melanomalar ve hematopoetik neoplazilerde bu sitokinin hücre stabilizasyon programı özellikle bozulmaktadır.

TGF β 'nin tümör gelişimi ve fibrozisteki pozitif etkisi E-cadherin baskılayıcıları ve EMT (Epithelial-Mesenchymal-Transition) uyarıcılarının etkinleşmesi ile EMT kapasitesiyle ilişkilendirilmiştir (224). EMT normal gelişim süreci için vazgeçilmezdir ve karsinogenezin temel mekanizmalarından biridir (225). EMT, E-cadherin ifadesi ve epitel hücre bağlantılarının düşüklüğü ya da yokluğu ve hücre iskeletinin mezenkimal paterne doğru yönelmesi sonucunda hücrenin hareketlilik ve invaziv özellik kazanmasıdır. TGF β , EMT'yi uyararak kanser hücrelerine istila ve yayılma özelliği kazandırmış olmaktadır. Kanserde, TGF β teşvikli EMT, tümör oluşturabilecek kapasitede transforme olmuş epitel hücrelerinde gerçekleşir (222). Bu bağlamda, EMT programı tümör hücrelerinin çevreye yayılmasını ve hareketlilik kazanmasının sağlayarak tümörün yayılmasına yardımcı olmuş olur.

TGF β 'nin kanser ilerlemesinde metastazda da etkisi vardır. TGF β ifadesi meme kanserinde metastatik ilerleme ile ilişkilendirilirken (226), ER-negatif meme kanserlerinde TGF β

reseptörlerinin düşük ifadesi iyi prognozla ilişkilendirilmiştir (227). Ayrıca, TGF β sinyalinin engellendiği ışın tedavisi veya kemoterapi almış meme tümörlü farelerde akciğer metastazının önlendiği gösterilmiştir (228).

2.3.3.1. TGFB/SMAD YOLAĞI VE LENFOMAGENEZ

Lenfoid hücrelerin proliferasyon, matürasyon, aktivasyon ve eliminasyonunun sıkı bir şekilde düzenlenmesiyle immün sistem denge halinde tutulur (229).

Otoreaktif lenfositlerin ortadan kaldırılması suretiyle oluşturulan immün yanıt ile hücre miktarının kontrol altında tutulması, immün sistemin denge halinin sürdürülmesindeki esas süreç olan apoptozis ile sağlanır. TGF β 1 normal lenfoid hücrelerde anti-proliferatif ve pro-apoptotik aktivitesi ile bu sürecin bir parçasıdır (230).

TGF β 'nın lenfopoetik gelişimdeki rolü, TGF β 1'den yoksun farelerde lenfositlerdeki aşırı proliferasyon ile desteklenmiştir. Hematopoetik hastalıkların birçok çeşidinde, neoplastik hücrelerin sınırsızca proliferasyonuna sebep olan, TGF β aktivitesine karşı duyarlılıkta kayıplar gözlenmiştir (231). Birçok lenfoma ve lösemi tanı grubunda tümör hücrelerinin hiçbir düzenleyici etkisi olmamasına rağmen TGF β 1 üretmeye devam ettiği bilinmektedir (232).

İnsan B hücre orijinli NHL hücre hattında (HT58) endojen olarak üretilen TGF β 1'in devam eden hücre proliferasyonuna etki etmediğini ancak ekzojen olarak verilen TGF β 1'in apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (233).

TGF β 1 lenfoid hücrelerin proliferasyonu ve hücre ölümünde önemli bir düzenleyici rol oynamaktadır. Ancak endojen olarak üretilmesine rağmen TGF β 1'in inhibitör etkisi yapamamasının birkaç sebebi olabilir. Bunlardan biri otokrin olarak TGF β 1 aktive edilememesi ya da aktive edilmişse hücre içi sinyal yollarındaki hatalardır. Bu hataların sebepleri şunlar olabilir (231);

1. Yolaktaki bir genetik hata
2. İnhibitör Smadların etkisi
3. Apoptozisi önleyen ve sürekli proliferasyona yardımcı olan sağkalım faktörlerinin devamlı üretimi

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, pro-apoptotik TGF β 'nın lenfoma hücrelerinde, endojen I-Smadların ifadesi ve anti-apoptotik sağ kalım faktörleri tarafından baskılandığını düşündürmüştür (231).

HT58 lenfoma hücre hattında Smad2 fosforilasyonu, R-Smad nükleer translokasyonu ve Smadlardan sorumlu gen TIEG'in aktivasyonu Smad rotasının ekzojen TGF β 1 muamelesi sonrasında çalıştığını göstermektedir. Bu durum da lenfomalarda Smad sinyalinin ekzojen olarak aktive edilebileceği anlamına gelmektedir. Bu çalışmadaki veriler HT58 hücrelerinde birçok TGF β 1 tarafından hedeflenen P15, P16 ve cyclinD1 gibi hücre döngüsü regülatör genlerinin ifadesinin, ekzojen TGF β 1 muamelesinden sonra değişmediğini göstermiştir. Bu sonuç;

1. TGF β 'nin anti-proliferatif ve pro-apoptotik etkisinden sorumlu iki farklı yolak olduğunu ya da
2. Proliferasyon genlerinin düzenlenme mekanizmalarının çöktüğünü göstermiştir (231).

2.4. LAZER MİKRODİSEKSİYON

Bu tez çalışmasında folliküler lenfoma hücreleri ve follikül mikroçevresinin incelenebilmesi için lazer mikrodiseksiyon yöntemi kullanılmıştır.

Folliküler lenfoma mikroçevresinde bulunan FOXP3⁺ regülatör T hücreleri, CD163⁺ tümör ilişkili makrofajlar gibi hücreler neoplastik folliküllerde bulunurlarken, follikül dışı bölgelerde de bulunmaktadır. Bu nedenle lazer mikrodiseksiyon yöntemi ile sadece neoplastik folliküller ayrıştırılarak çalışmanın sonraki aşamalarında elde edilecek sonuçların güvenilirliğinin artırılması amaçlanmıştır. Morfolojik ve fonksiyonel olarak farklı hücre tiplerinden oluşan insan dokularındaki bu çeşitlilik tümör hücrelerinde çok daha fazladır. Patolojik araştırmalarda belli hücrelerin diğerlerinden ayırt edilerek incelenmesi önemli biyolojik süreçlerin aydınlatılmasında çok büyük role sahiptir. Lazer mikrodiseksiyon yöntemi ile heterojen yapıya sahip dokulardan incelenmek istenen hücreler hızlı ve güvenilir bir şekilde ayrıştırılabilmektedir.

Bu metot 1986 yılında tanımlanmıştır (234). LMD ile ilgili ilk yayın 1996'da Science dergisinde yayınlanmıştır (235). LMD teknolojisi Arcturus (Molecular Devices, Inc. Sunnyvale, CA, USA) tarafından ilk olarak piyasaya sürülmüştür. Arcturus'u takiben The Palm Microbeam (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Bernried/Germany) ve Leica LMD6000 (Leica Microsystems Inc., Bannockburn, IL, USA) LMD sistemleri geliştirilmiştir.

LMD sistemi, ışık mikroskobu ile hücrelerin görüntülenmesini ve ayrıştırılmasını sağlayan bir lazer cihazının bağlanmasına dayanır. Genel olarak iki farklı LMD sistemi mevcuttur;

1. İnfrared (IR) LMD sistemi
2. Ultraviyole (UV) LMD sistemi (236).

2.4.1. INFRARED LMD (IR-LMD)

1996'da Emmert-Buck ve arkadaşları NIH'de bu sistemi tanıtmışlardır. Bu sistemden bir yıl sonra Arcturus Engineering tarafından PixCell adlı sistem ile ticarileştirildi. PixCell platformu, doku kesitinin üzerine ince transparan bir termoplastik filmin yerleştirilmesi temeline dayanır. Doku mikroskobik olarak görüntülenir ve hedef hücrelerin sabit bir pozisyonda, kısa süreli odaklanmış bir IR-lazer atışı ile filme yapışması sağlanır (235).

Hücrelerin filme, lama olan yapışkanlığından daha fazla yapışmaya başlarlar ve bu da seçilen hücrelerin hare-ket etmesini sağlar (237). Daha sonra seçilen hücreler filmin kaldırılması ile ayrıştırılır. DNA ya da RNA izolasyonu için gerekli solüsyonun bulunduğu tüpe aktarılır (238).

2.4.2. UV-LMD

1998'de, Schütze ve Lahr UV temelli LMD sistemini geliştirmişlerdir (12). Şu anda, bu platformlar 6µm membranın yerleştirildiği lamlara alınan dokulardan UV-lazer ışınıyla direkt görüntüleme ile gerçekleşir (235,239).

Dar bir lazer ışını ile ilgilenilen hücre ve hücrelerin etrafı çizilerek, istenmeyen dokudan ayrışmaları sağlanır (240). Lazerin gücünün artışıyla birlikte ilgilenilen hücreler kesilir ve aşağıda bulunan tüpe yerçekimi etkisiyle düşürülür. Bu sistem PALM Zeiss Microlaser Technologies tarafından ticarileştirilmiştir (236,241).

LMD tekniği, histolojik örnekler, canlı hücreler ve hücre kültürleri, bitki materyali, kromozom yaymaları, adli tıp çalışmaları, FFPE ya da taze dokular (boyalı veya boyasız) örneklerde kullanılabilir.

LMD işlemini kolaylaştırmak için çok sayıda kit halihazırda piyasada mevcuttur. Örnek hazırlığı, LMD için en çok önem arz eden aşamalardan biridir. Optimal LMD için doku kesitleri 5-15 µm kalınlığında olmalıdır. 5 µm'den ince olan kesitler hücrenin bütününe almaya engel olabilirken, 15 µm'den kalın olanlar ise kesme aşamasında başarısız olabilir.

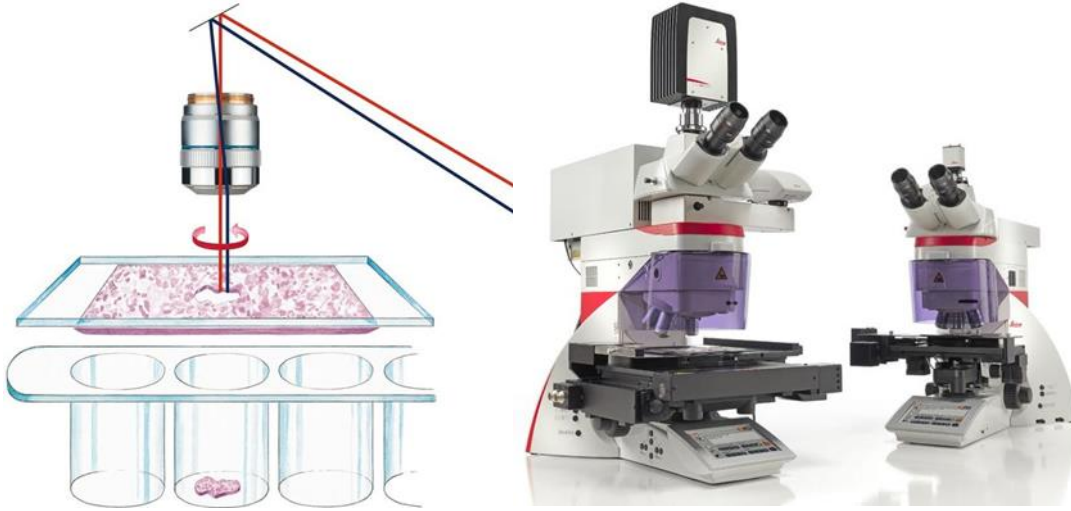
Doku kesitlerinin alınması tamamlandıktan sonra boyama aşaması uygun protokollerle gerçekleştirilir. Mikrodiseksiyonun tamamlanmasının ardından, başlıkta bulunan hedef hücreler moleküler analizler için kullanılır (242). FFPE dokular patoloji laboratuvar arşivlerinde on yıllarca saklanır. Bu süreçte nükleik asit-protein çapraz bağları oluşabilmektedir. FFPE dokulardan protein izolasyonu bu nedenle verimli olmamakla birlikte, RNA izolasyonu gerçekleştirmekte ve RT-PCR ve cDNA microarray çalışmaları yapılabilmektedir (243).

2.4.3. LMD'NİN AVANTAJ VE DEZAVANTAJLARI

En önemli avantajlar, hızlı, kesin ve çok amaçlı kullanıma sahip olunmasıdır. Lazerin büyüklüğü, dokunun mimari özellikleri, mikrodiseksiyonun hassasiyetine göre binlerce hücre toplanabilmektedir (244). LMD çok hızlıdır ve hedef hücrenin yanındaki hücreye zarar vermez, aynı lam üzerindeki farklı tüpte hücreler örneklenebilir. Film ve düşük güçlü lazerden oluşmuş ısı DNA, RNA ya da protein kalitesini etkilemez. 1999'da Banks ve arkadaşları, LMD ile ve daha geleneksel yöntemlerle elde edilmiş hücrelerin protein profillerini karşılaştırdığında önemli farklar olmadığını elektroforezle göstermiştir (245).

2.4.4. LEİCA LMD SİSTEMLERİ

Leica'nın iki farklı LMD sistemi bulunmaktadır. LMD6 (Şekil 2.13.) ve LMD7. İki sistemin birbirlerinden farkı lazer gücü ve kullanım alanı çeşitliliğidir. LMD6, doku kesitlerinden tek hücre ya da tümörlü doku izolasyonu gibi standart LMD uygulamaları için daha uygunken, LMD7 daha güçlü bir lazere sahip ve lazer atış sıklığının ayarlanabilmesi gibi avantajları vardır. Ayrıca kemik, diş, ağaç ya da bitki dokuları gibi sert dokuların diseksiyonu için uygun bir platformdur. LMD6'nın lazer dalga boyu 355nm, atış sıklığı 80Hz, atış uzunluğu <4 ns, maksimum atış enerjisi 70 μ J'dur.



Şekil 2.13. Leica LMD6 sistemleri (246).

Bu sistem hızlı ve güvenilir bir lazer kesim imkanı sağlamaktadır. Lazer ışınının kesim hızı, şiddeti ve aralığının ayarlanabilmesi çalışmaya uygun bir yol izlenmesine izin vermektedir.

Bilgisayara bağlı bir sistem olan LMD6'da hedef hücre ya da dokuları mikroskop aracılığıyla monitörde görüntülenir ve bu görüntü üzerinden ilgilenilen hücre ve doku bölgeleri ister monitör üzerinde özel bir kalem ya da mouse yardımıyla çizerek belirlenir. Ardından seçilen alanların kesilmesi için gerekli lazer ayarları yapılır. Lazerin hızı, gücü ve aralığı/keskinliği dokuya göre ayarlanır.

Diğer sistemlerin aksine bu sistemde membran değil hareket ettirilerek kesim gerçekleştirilir. Ayrıca başlık/tp membranın alt kısmında bulunur ve kesilen hücre ya da doku bölgelerinin yerçekimi ile başlığa düşmesi sağlanır. LMD6 objektifleri 5x, 6.3x, 10x, 20x, 40x, 63x ve 150x'tir. Yapılacak çalışmaya göre kullanılacak membran çeşidi belirlenmektedir. Farklı alışmalar için çok sayıda membran türü bulunmaktadır. Bu membranlar cam ya da elik malzemedен yapılmış lamaların n yüzeyine tutturulmuş haldedir (247).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Foliküler lenfoma klinik seyir açısından çeşitlilik gösteren bir lenfoma alt sınıfıdır. Özellikle düşük gradeli hastaların evreleri ve aynı evredeki hastaların prognozları farklılık gösterebilmektedir. Bununla birlikte hastalara uygulanacak tedavi alternatifleri de çeşitlidir. Ancak klinik seyirleri çeşitlilik gösteren FL hastalarının tedaviye yanıtları da bu nedenle değişiklik göstermektedir. Bu çeşitliliğin altında yatan nedenler hala araştırılmaya devam etmektedir. FLIPI (Follicular Lymphoma International Prognostic Index)'de göz önüne alınan yaş, evre, lenf nodu sayısı, hemoglobin düzeyi, serum LDH düzeyi, kemik iliği tutulumu gibi klinik risk faktörlerinin yanı sıra son yıllarda tümör mikroçevresinin de prognostik önem taşıdığı anlaşılmaya başlanmıştır. Literatürde, tümör mikroçevresi kompozisyonunun, sağ kalım üzerinde olumlu ya da olumsuz etkiye sahip olabileceği ve hatta tedavi yanıtında da belirleyici rol oynayabileceğine dair veriler göze çarpmaktadır. TGF β /Smad sinyal yolağının, tümör gelişimini baskılayıcı ya da teşvik edici etkileri olduğu ve bunun da tümör mikroçevresindeki hücrelerin fonksiyonlarını düzenlemek suretiyle gerçekleştiğine dair veriler literatürde bulunmaktadır. Tümör mikroçevresinin FL prognozundaki etkisi ve TGF β /Smad sinyal yolağının bu süreçteki potansiyel fonksiyonuna literatürdeki bilgilerin netlik kazanmasına yardımcı olabileceği düşünülerek yapılan bu tez çalışmasında, TGF β /Smad yolağının düşük dereceli (Grade 1-2) folliküler lenfoma mikroçevresindeki düzenleyici etkisi ile klinik prognostik özellikler ve transformasyon olasılığındaki rolünün incelenmesi amaçlanmıştır. TGF β /Smad yolağının, düşük dereceli (Grade 1-2) folliküler lenfomaların mikroçevresindeki düzenleyici etkisinin, klinik prognostik özelliklerle ilişkisi olduğu hipotezinden yola çıkılan bu tez çalışmasında,

1. Folliküler lenfoma gibi çok farklı klinik seyirlere sahip lenfoproliferatif hastalıkta, Treg hücreler veya tümör ilişkili makrofajlardan zengin mikroçevrede TGF- β /Smad yolağının rolünün incelenmesi,
2. Elde edilen sonuçlar ışığında hastaların klinik ve patolojik prognostik parametreleri ile TGF β /Smad yolağı proteinlerindeki ifade değişikliklerinin ilişkilendirilmesi ve folliküler lenfomanın klinik davranışındaki rolünün araştırılması hedeflenmiştir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde bulunan folliküler lenfoma tanısı almış vakaların içinden ilk aşamada 110 adet hasta belirlenmiştir. Belirlenen hastaların arşivimizde formalinle fikse parafine gömülü (FFPE) blokları olanlar tespit edilerek vaka havuzu daraltılmıştır.

Bu vaka havuzundan klinik verilerine ulaşılan 25 Grade 1-2 FL tanılı hasta örneği ve ayrıca kontrol grubunu oluşturmak üzere 5 reaktif folliküler hiperplazi hasta örneği değerlendirmeye alınmıştır. Seçim aşamasında arşiv materyalinde tanı amaçlı daha önce yapılmış olan belirteçlerden özellikle BCL2, BCL6, dendritik hücre belirteçleri CD21-CD23, T hücre belirteci CD3, makrofaj belirteci CD68 ve proliferasyon belirteci KI67 değerlendirilmiş ve skorlanmıştır. Tüm örneklerde infiltrasyon alanında >%80 folliküler patternde tutulum bulunmaktadır. Hastaların uygun parafin blokları çalışma amaçlı belirlenmiştir.

4.2. YÖNTEM

TGFβ/Smad yolağının folliküler lenfoma mikroçevresindeki düzenleyici etkisi ile prognoz ve transformasyonda rol oynayabileceği hipotezi doğrultusundaki bu tez kapsamında; folliküler lenfoma örnekleri immünohistokimya yöntemi ile, Treg hücreler için FOXP3 ve tümör ilişkili makrofajlar (TİM) için CD163 monoklonal antikorları kullanılarak immunfenotipik olarak değerlendirilmiştir. Sonrasında bu iki ayrı grupta ve kontrol grubunda TGFβ/Smad yolağında yer alan transkripsiyon faktörlerinin ifade düzeyleri mRNA seviyesinde qRT-PCR yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

4.2.1. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ANALİZLER

Folliküler lenfomaların prognozunu etkileyen mikroçevre elemanlarından Treg hücreleri (Treg) belirteci olarak FOXP3 ve tümör ilişkili makrofajların (TİM) belirteci olarak CD163'ün ifadeleri, immünohistokimyasal yöntemle analiz edilmiştir. FOXP3 için, Epitomics (Rabbit Monoclonal) Anti-FOXP3 (Clone EP340), CD163 için Cell Marque CD163 (MRQ-26) (Mouse Monoclonal) antikorları kullanılmıştır. İmmünohistokimyasal

boyama işlemi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı İmmüнопатoloji laboratuvarında bulunan Ventana Benchmark ULTRA otomatik immunboyama cihazıyla yapılmıştır.

Bu aşamada aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır;

1. Seçilmiş olan parafine gömülü dokulardan mikrotom ile pozitif yüklü lamlara 4µm'lik kesitler alınmıştır.
2. Üzerinde kesitlerin bulunduğu lamalar, 56°C'ye ayarlanmış etüvde yaklaşık bir saat inkübe edilerek kesitlerin lama yapışması sağlanmıştır.
3. Kullanılacak antikorlardan CD163 herhangi bir dilüsyon yapmaksızın kullanıma hazır şekilde uygulanmıştır. FOXP3 antikoruna 1/100 dilüsyon yapıldıktan sonra kullanılacak şekilde optimize edilmiştir.
4. Ventana Benchmark ULTRA cihazında işlem tamamlandıktan sonra boyanmış olan lamalar alınarak, lamelle kapatma öncesi hazırlıkları tamamlanmıştır. Bu hazırlık sırasında, lamalar önce sabunlu su dolu bir şaleye 5-10 defa daldırıp çıkarma suretiyle yıkanmıştır. Sonrasında distile su dolu başka bir şalede durulanmıştır. %96-100 saflıkta etanol ile dolu bir şalede birkaç dakika bekletildikten sonra 56°C'ye ayarlanmış etüvde 5 dakika inkübe edilerek kurutulmuşlardır. Kurutulan lamalar, lamelle kapatılmadan önce birkaç sefer ksilen dolu bir şaleye daldırılıp çıkartılmış ve sonrasında üzerlerine bir-iki damla balsam (mount) damlatıldıktan sonra lamelle kapatılmış ve oda sıcaklığında kurumaları sağlanmıştır.
5. İncelenmeye hazır hale gelen lamalar, Prof. Dr. Işın Kuzu ve Şenay Boyacıgil KÖM tarafından değerlendirilmiştir. Bütün örnekler neoplastik folliküllerdeki mikroçevrenin değerlendirilmesinde boyanan hücrelerin yoğunluğuna göre FOXP3 ve CD163 ifadesi açısından derecelendirilmiştir. Antijenlerin neoplastik folliküller içerisindeki hücrelerde ifade oranına göre semi kantitatif olarak 0-3 arasında skorlanmıştır. Buna göre skorlamada: Hiç pozitif hücre bulunmadığında veya hücre sayısı %5 in altında ise skor: 0, hücre oranı %6-%25 ise Skor 1, hücre oranı %26-%50 ise Skor 2, >%51 ise Skor 3 olarak belirlenmiştir. Tüm vakalarda BCL2 ifadesi ile neoplastik reaktif follikül ayırımı yapılmıştır.

4.2.2. LAZER MİKRODİSEKSİYON (LMD)

Lenfoma dokularında sadece neoplastik folliküllerdeki mikroçevreyi değerlendirmek ve bunun dışındaki hücrelerin etkisini dışlamak için lazer mikrodiseksiyon (LMD) yöntemi kullanılmıştır.

4.2.2.1. LMD öncesi hazırlıklar

Lazer mikrodiseksiyon işleminde, FFPE bloklardan yapılan kesitler 2 µm kalınlığındaki PEN membranslide üzerine alınmıştır. Çalışmanın bütün aşamalarında steril ortam ve malzemeler kullanılmıştır. Elde edilen kesitlerden LMD sonrası RNA izolasyonu yapılacağından, RNAazlardan uzak çalışma koşulları sağlanmıştır. Bunun için;

1. Kullanılan mikrotom, mikrotom bıçakları ve su banyosu RNAase away (Thermo Scientific™, 7000TS1) ile temizlenmiştir.
2. Kullanılan membranlar, membran lam kutularında RNAase away ile muamele edildikten sonra DEPC içeren su ile durulanmıştır. Ardından 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve DEPC etkinliği inaktif edilmiştir.
3. Su banyosu için kullanılacak sular, bir litre suya 1ml DEPC olacak şekilde ilave edildikten sonra gece boyu karıştırıcıda bırakılmış ve ertesi gün otoklavlandıktan sonra kullanılmıştır.

4.2.2.2. FFPE dokulardan kesit alınması

Aşağıdaki işlem basamakları izlenmiştir:

- 1- Arşivden çıkarılan FFPE bloklardan kesit alınması aşamasında Shandon Finesse 325 Manuel Mikrotom (Thermo, A77500016) cihazı kullanılmıştır.
- 2- Arşivden çıkarılan parafin bloklar -20°C'de yaklaşık 30 dakika bekletildikten sonra steril edilmiş olan mikrotom cihazına yerleştirilmiştir.
- 3- Dokunun büyüklüğüne göre her membrana 1 ya da 2 kesit olacak şekilde her bloktan 10 µm kalınlığında 2 kesit alınarak 45°C sıcaklığındaki su banyosuna atıldıktan sonra dokunun katlanmaması ya da kıvrılmamasına özen gösterilerek membran üzerine alınmıştır.

- 4- Örnekler arasındaki kontaminasyondan kaçınmak için her blok için ayrı bir mikrotom bıçağı kullanılmıştır.
- 5- Kesitler membran üzerine alındıktan sonra, 56°C'ye ayarlanmış etüvde yaklaşık bir saat bekletilerek kesitlerin lama yapışması sağlanmıştır.

4.2.2.3. Deparafinizasyon

Kesitlerin üzerinde bulunduğu membranlar, iki ayrı kaptaki ksilende 5'er dakika bekletildikten sonra, sırayla %100, %95 ve %70 saflıktaki etanolde 5'er dakika bekletilerek deparafinize edilmiştir. Her örnek sonrasında ksilen ve alkoller değiştirilerek örnekler arası kontaminasyondan kaçınılmıştır.

4.2.2.4. Kesitlerin Toluidin Blue ile Boyanması

10,5 gr toz halindeki toluidin blue boyası 20 ml %96-100 etanolde çözdürülmüştür.

Toluidin blue-etanol çözeltisinin üzerine 80 ml distile su eklendikten sonra iyice karıştırılmış ve boya hazırlığı tamamlanmıştır.

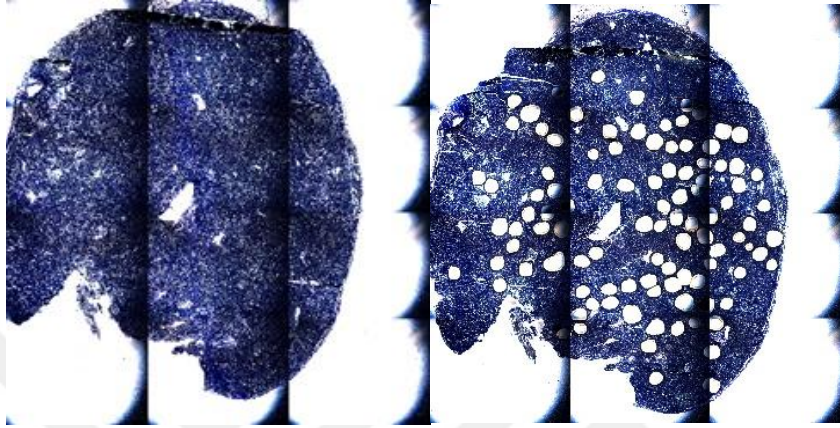
Toluidin Blue Boyaması:

1. Membranlar distile suda yıkanmıştır.
2. Hazırlanmış olan toluidin blue boyası bulunan şalede membranlar 2-3 dakika bekletilerek boyanmaları sağlanmıştır.
3. Boyama sonrasında membranlar distile su ile tekrar nazikçe yıkanmıştır.
4. Membranlar dehidrasyon amacıyla %96-100 etanolden geçirilip, oda sıcaklığında kurutulmuştur.

Bu aşamalarda kullanılan bütün solüsyonlarda ve kesit için kullanılan sıcak su banyosundaki sular DEPC ile en az 24 saat muamele edilmiş ve ardından otoklavlanmıştır. Ortam temizliği için Rnase away kullanılarak RNAaz'lardan uzak bir çalışma gerçekleştirilmeye çalışılmıştır.

Bu membranlar üzerindeki kesitlerde Toluidin Blue Boyası ile neoplastik folliküller görülür hale gelmiş ve lazer mikrodiseksiyon cihazında sadece neoplastik follikül yapıları kesilerek bunlar çalışma için toplanmıştır. Şekil 4.2.'de LMD öncesi doku ve LMD sonrası doku kesiti görüntüleri bulunmaktadır.

LMD öncesi ve sonrası örneklerin görselleri Şekil 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. LMD öncesi ve sonrası doku görselleri.

4.3. RNA İZOLASYONU

Beş adet kontrol vakası olmak üzere toplamda 26 vaka için FFPE doku örneklerinden lazer mikrodiseksiyon ile seçilen alanlardan Qiagen Rneasy FFPE kit (Cat. No:73504) ile total RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA'ların saflıkları ve konsantrasyonları spektrofotometre ile ölçülmüştür. Konsantrasyon ve saflık değerleri tez çalışmasında kullanılmaya yeterli olmayan örneklerde izolasyon tekrarlanmıştır. İzolasyon süreci sonunda, tez çalışmasında kullanılmak üzere hedeflenen RNA kütüphanesi hazırlanmış ve -80°C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Aşağıdaki protokol takip edilmiştir;

1. Lazer mikrodiseksiyon esnasında 0,2 ml'lik PCR tüpüne alınan örnek RNA izolasyon aşamasına kadar -80°C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. RNA izolasyonuna başlanacağı sırada her tüpe 75 µl, Buffer PKD transfer edilmiştir. Örnekler pipet ucuyla iyice ezerek karıştırılmıştır.
2. Örnekler 10µl Proteinaz K (20mg/ml) eklenmiş ve hafifçe pipetaj yapılarak karıştırılmıştır.
3. Örnekler 56°C'de gece boyu inkübe edilmiştir.

4. Tüpler ters düz edilerek, 80°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir.
5. Tüpler buz üzerinde 3 dakika bekletildikten sonra 20000 x G (13,500 rpm)'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
6. Supernatant, pellete dokunmamaya dikkat edilerek yeni bir mikrosantrifüj tüpüne transfer edilmiştir.
7. Örnek toplam hacminin onda birine denk gelecek hacimde (yaklaşık 16µl) DNase Booster Buffer ve 10µl DNase I stock solüsyonu eklenmiştir. Tüpü ters çevirmek suretiyle karışması sağlanmıştır. DNase I stock solüsyonu fiziksel olarak denatürasyona duyarlıdır olduğundan vorteks yapılmamalıdır. Kısaca santrifüj yaparak tüp kenarındaki sıvı artıklar aşağıya indirilmiştir.
8. Örnekler oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir.
9. Bağlanma koşullarını sağlamak için tüplere 320µl Buffer RBC eklenmiştir. Bağlanmayı artırmak için lizat nazikçe pipetaj yapılarak iyice karıştırılmıştır.
10. Örnekler 720µl etanol (%100) eklenmiş ve nazikçe pipetaj yapılarak iyice karıştırılmıştır. Etanol eklendikten sonra çökeltiler gözlenebilir, bu durum prosedürü etkilemez. Oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletildikten sonra santrifüj yapılmadan bir sonraki adıma geçilmiştir.
11. Örneklerden çökeltileri de içeren 700µl alınarak RNeasy MinElute spin column'a transfer edilmiştir. Kapak nazikçe kapatıldıktan sonra 15 saniye $\geq 8000 \times G$ ($\geq 10,000$ rpm) santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası koleksiyon tüpü boşaltılmıştır ve aynı tüp 12. basamakta da kullanılmıştır.
12. Adım tüm örnek RNeasy MinElute spin column'dan geçene kadar tekrar edilmiştir. Koleksiyon tüpü 13. basamakta da kullanılmıştır.
13. 500µl Buffer RPE, RNeasy MinElute spin column'a eklenmiştir. Spin kolon membranının yıkanması için kapak nazikçe kapatıldıktan sonra 15 saniye $\geq 8000 \times G$ ($\geq 10,000$ rpm) santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası koleksiyon tüpü boşaltılmıştır ve aynı tüp 14. basamakta da kullanılmıştır.
14. RNeasy MinElute spin column'a 500µl Buffer RPE eklenmiştir. Spin kolon membranının yıkanması için kapak nazikçe kapatıldıktan sonra 2 dakika $\geq 8000 \times G$ ($\geq 10,000$ rpm) santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüpü içindekiyle birlikte atılmıştır.

15. RNeasy MinElute spin column yeni bir 2 ml'lik koleksiyon tüpüne yerleştirilmiştir. Spin kolonun kapağı açılmış ve 5 dakika maksimum hızda santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüpü iindekiyle birlikte atılmıştır.
16. RNeasy MinElute spin column yeni bir 1.5 ml'lik koleksiyon tüpüne yerleştirilmiştir. 14-30 l RNase-free su direkt olarak spin kolonun membranına eklenmiştir. Kapak nazikçe kapatıldıktan sonra 2 dakika bekletilmiş ve 1 dakika maksimum hızda santrifüj yapılarak RNA el e edilmiştir.

Elde edilen RNA  rnekleri spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. İmphen NanoPhotometer® P 300 sistemi ile RNA  rneklerinin konsantrasyonları ölçülmüştür. Fenol ya da protein kontaminasyonu olup olmadığını gösteren A260/280 ve A260/230 oranları da tespit edilmiştir.

4.4. CDNA SENTEZİ VE OPTİMİZASYON ALIşMALARI

Elde edilen RNA  rneklerinden RT2 First Strand Kit (Qiagen, #330404) cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu protokolda iki aşamalı olarak cDNA sentezi gerçekleştirilmektedir. İlk aşamada olası genomik DNA eliminasyonu yapılırken, sonrasında reverse transkripsiyon aşaması yer almaktadır. Elde edilen RNA konsantrasyonlarına göre toplam 400 ng/rxn total RNA olacak şekilde cDNA sentez aşamasına girilmiştir.

Genomik DNA eliminasyonu için izelge 4.1'e göre hazırlık yapıldıktan sonra örnekler 42 C'de 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 5 dakika inkübasyonun ardından en az 1 dakika süreyle buzda bekletilmişlerdir. Akabinde izelge 4.2'e göre reverse-transkripsiyon karışımı hazırlanarak, buzda bekleyen tüplere dağıtılmıştır.

Çizelge 4.2.'de belirtildiği gibi reverse-transkripsiyon karışımı hazırlanarak, buzda bekleyen tüplere dağıtılmıştır. cDNA sentez kitinin güncel ve eski protokollerinde bileşenler değişmemesine rağmen farklı inkübasyon protokolleri olduğu gözlenmiştir. Bu sebeple optimizasyon denemelerinde kullanmak için izole edilen ilave bir adet RNA numunesi kullanılarak ideal s renin hangisi olduğuna karar vermek amacıyla deneme reaksiyonu kurulmuştur. Her iki reaksiyon da aynı RNA örneğinden, birebir aynı içerikler hazırlanarak kurulmuştur. Reaksiyon koşullarından güncel olanında (2017-2018 katalogu) 42 C'de 15

dakika, 95°C’de 5 dakika ve 4°C’de bekleme önerilir iken; eski katalogda (2014-2017 arası) 37°C’de 1 saat, 95°C’de 5 dakika ve 4°C’de bekleme önerilmektedir.

Çizelge 4.1. cDNA sentezi genomik DNA eliminasyon aşaması protokolü.

Komponent	Miktar
RNA	400 ng/rxn
Buffer GE	2 µl
RNase- free su	Değişken
Toplam hacim	10µl

Çizelge 4.2. cDNA sentezi reverse-trasnkripsiyon aşaması protokolü.

Komponent	Hacim (1 reaksiyon için)
5x Buffer BC3	4 µl
Control P2	1 µl
RE3 Reverse Transcriptase Mix	2 µl
RNase-free su	3 µl
Toplam Hacim	10 µl

4.5. PRİMERLERİN ÇALIŞMA ŞARTLARININ BELİRLENMESİ

TGFβR1, Smad2, Smad3, Smad4, Smad6, Smad7, SARA (ZFYVE9) ve P15 (CDKN2B) genlerinin primer optimizasyonları için 1/3 cDNA dilüsyonu kullanılarak 57, 58, 60 ve 62°C bağlanma sıcaklıklarında gradient PCR kurulmuştur. Kullanılan primerler Qiagen tarafından Sybr Green ile ifade analizi için özel olarak tasarlanmış, spesifitesi ve amplifikasyon verimi açısından başarısı onaylanmış primerlerdir. Kullanılan primerlerin bilgileri aşağıdaki Çizelge 4.3’de belirtilmiştir.

Çizelge 4.3. Tez çalışmasında kullanılan primer setleri, Qiagen.

Gen Adı	Kitin Adı	Katalog Numarası
TGFβR1	<u>RT² qPCR Primer Assay for Human TGFβR1</u>	PPH00237C
SMAD2	<u>RT² qPCR Primer Assay for Human SMAD2</u>	PPH01949F
SMAD3	<u>RT² qPCR Primer Assay for Human SMAD3</u>	PPH01921C
SMAD4	<u>RT² qPCR Primer Assay for Human SMAD4</u>	PPH00134C
SMAD6	<u>RT² qPCR Primer Assay for Human SMAD6</u>	PPH01910F
SMAD7	<u>RT² qPCR Primer Assay for Human SMAD7</u>	PPH01905C
SARA (ZFYVE9)	<u>RT² qPCR Primer Assay for Human ZFYVE9 (SARA)</u>	PPH13228A
CDKN2B (P15)	<u>RT² qPCR Primer Assay for Human CDKN2B (P15)</u>	PPH00206C
Actin (ACTB)	<u>RT² qPCR Primer Assay for Human ACTB</u>	PPH00073G

Termal döngü programı Çizelge 4.4’de belirtildiği gibidir. Elde edilen PCR ürünleri %2’lik agaroz jelde yürütülmüştür.

Çizelge 4.4. Primer bağlanma ısılarının optimizasyonunda uygulanan gradient PCR protokolü.

Sıcaklık	Süre	Döngü
95 ⁰ C	5 dakika	40
95 ⁰ C	30 saniye	
57-62 ⁰ C	30 saniye	
72 ⁰ C	45 saniye	
72 ⁰ C	5 dakika	
12 ⁰ C	∞	

4.5.1. GENLERİN İFADE DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ ÖNCESİ PRİMERLERİN QRT-PCR OPTİMİZASYONLARI

QRT-PCR'da ilgili genlerin ifade düzeyini belirlemek için öncelikle hangi cDNA konsantrasyonunun çalışmaya uygun olduğunu tespit etmek gerekmektedir. Bunun için hasta ve kontrol cDNA'larının 1:2, 1:4, 1:5 ve 1:10 seri dilüsyonları kullanılarak Çizelge 4.5'teki reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Reaksiyon koşulları Çizelge 4.6'da belirtildiği gibidir.

Çizelge 4.5. RT-PCR karışımı.

Komponent	Hacim
RT ² SYBR Green Mastermix	5 µl
cDNA	1 µl
RT ² QPCR Primer Assay (10µM stock)	0,4 µl
RNase-free water	4,2 µl
Toplam Hacim	10 ul

Çizelge 4.6. Rotor-Gene Cihaz protokolü.

Döngü	Süre	Sıcaklık
1	10 dakika	95 °C
40	15 saniye	95 °C
	30 saniye	60 °C

4.6. QRT-PCR ANALİZLERİ

Gradient PCR denemeleri sonucunda bütün primer çiftlerinin ortak çalışma sıcaklığının 60°C olduğu tespit edilmiş ve qRT-PCR deneylerinin tamamında bütün primerler için bu bağlanma ısı kullanılmıştır. Totalde 400ng cDNA içeren örneklerin dilüsyonları için yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda 1/3 dilüsyonun bütün primerler için ideal dilüsyon oranı belirlenmiş ve qRT-PCR deneyleri bu dilüsyon oranıyla gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın başında kullanılması planlanan “relative standard curve” metodu denenmiştir, ancak bu yöntemle analiz etmeye uygun veriler elde edilemediğinden “relative quantification” metoduyla (248) analizler gerçekleştirilmiştir.

$$R = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{Ptarget}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{Pref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

“Relative standard curve” metodunun “relative quantification” metodundan farkı her primer için amplifikasyon verimliliğinin ölçülmesidir. “Relative quantification” metodunda bu değer, polimeraz zincir reaksiyonunun her döngüsünde kalıp cDNA’nın iki katına çıkacağı teorik bilgisinden “2” olarak kabul edilmektedir. Ancak teoride böyle olmasına rağmen, pratikte primerler her zaman ideal şekilde amplifikasyon gerçekleştiremeyebilir. Bu nedenle daha güvenilir sonuç elde etmek için her primer çifti için yapılan PCR’da örneklerle birlikte, standard olarak bir cDNA örneği stok, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 olacak şekilde seri dilüsyon yapılmış olarak reaksiyona sokulmuştur. Ancak elde edilen ct (cycle threshold) değerleri “Relative standard curve” metodunun uygulanmasına izin vermemiştir. Bunun nedeni, stok olarak reaksiyona sokulan cDNA konsantrasyonu halihazırda düşük olduğundan ileri dilüsyon aşamalarında reaksiyon karışımında amplifikasyon elde edilecek kadar kalıp cDNA bulunmuyor olmasıdır. Bu nedenle her primer çifti için amplifikasyon verimliliği “2” olarak kabul edilerek “Relative quantification” metoduyla analizler gerçekleştirilmiştir.

qRT-PCR deneyleri Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı bünyesinde bulunan Roche LightCycler 480 cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar 384-well plate'lerde yapılmıştır. Her PCR plate'inde iki gen için bütün örnekler aynı anda üç teknik tekerrür olacak şekilde tasarlanmış ve uygulanmıştır. Reaksiyon karışımı Çizelge 4.7'ye göre hazırlanmış olup, Çizelge 4.8'deki cihaz protokolü uygulanmıştır.

Çizelge 4.7. RT-PCR karışımı.

Komponent	Hacim
RT ² SYBR Green Mastermix	6 µl
cDNA	2 µl
RT ² QPCR Primer Assay (10µM stock)	0,4 µl
RNase-free water	3,6 µl
Toplam Hacim	12 µl

Çizelge 4.8. LightCycler 480 Cihaz Programı.

Döngü	Süre	Sıcaklık
1	10 dakika	95 ⁰ C
40	15 saniye	95 ⁰ C
	1 dakika	60 ⁰ C
	30 saniye	72 ⁰ C
	30 saniye	95 ⁰ C
Melting curve	30 saniye	60 ⁰ C
	30 saniye	95 ⁰ C
Soğuma	10 saniye	40 ⁰ C

4.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Çalışmada elde edilen bütün verilerin istatistiksel analizleri, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı Doç.Dr. Beyza Doğanay Erdoğan ve araştırma görevlisi Zeynep Yavuz yardımı ile SPSS programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizlerde Mann Whitney U, Kruskal-Wallis, Fisher's Exact, Spearman korelasyon katsayısı metotları kullanılarak parametreler birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Tez çalışması kapsamında değerlendirilen nicel veriler, ortanca (minimum-maksimum) değerleri ile kategorik veriler ise frekans ve yüzdeler ile özetlenmiştir. Cinsiyet oranları bakımından FL ile kontrol grubu Fisher's Exact testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Gen ifadeleri bakımından, FL ile kontrol grubu ve FL grubunun içindeki alt grupların birbirleri ile karşılaştırılmasında uygun olarak Mann Whitney U testi ya da Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Tip-I hatayı kontrol etmek üzere belirlenen p değerleri üzerinde Benjamini-Hochberg düzeltmesi uygulanmıştır. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. DEMOGRAFİK BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 21 hastanın median yaşı 64 (Min: 33, Max: 79) bulunmuştur. Cinsiyet dağılımına bakıldığında, hastaların %47,6'sı kadın (n=10), %52,4'ünü (n=11) erkektir. Kontrol grubunun yaş ortalaması 35 (Min: 18, Max: 64) dir. Kontrol grubunda cinsiyet dağılımı 2 (%40) kadın, 3 (%60) erkek şeklindedir (Çizelge 5.1.).

5.1.1. FOLLİKÜLER LENFOMA GRADE DAĞILIMI

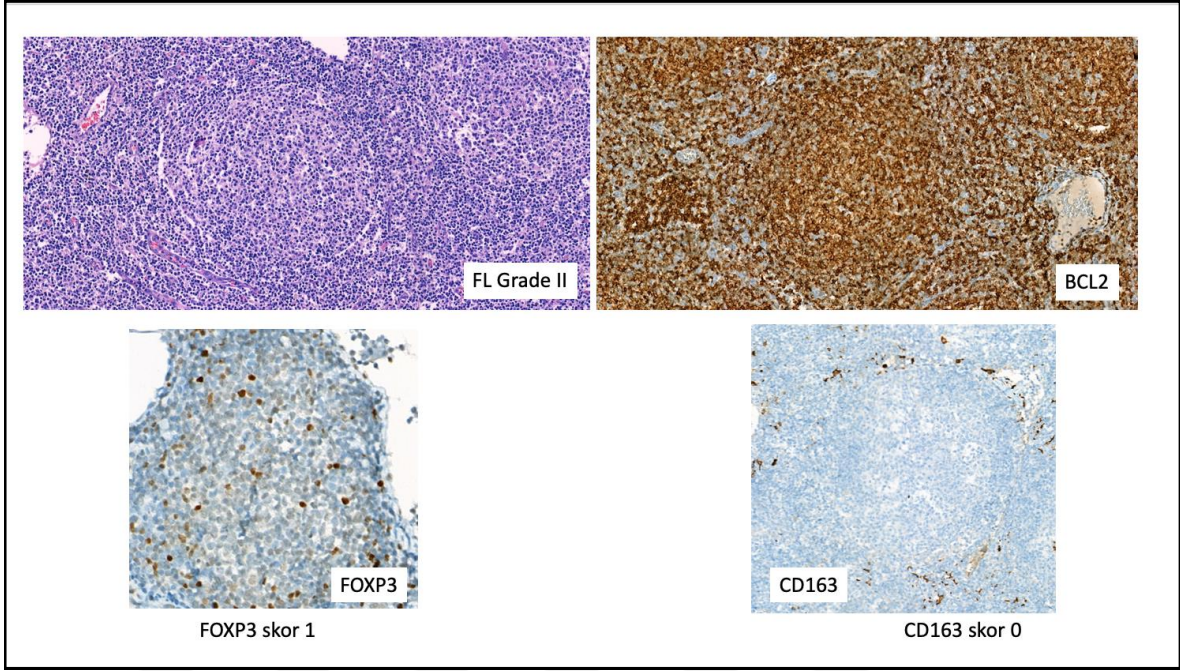
Düşük dereceli olarak gruplanan grade I-II FL hastaları tüm grubun %73,1'ini (n=19) oluşturmaktadır. Hastaların 2'si grade III FL tanılıdır (%7,7 (n=2)) (Çizelge 5.1.).

5.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

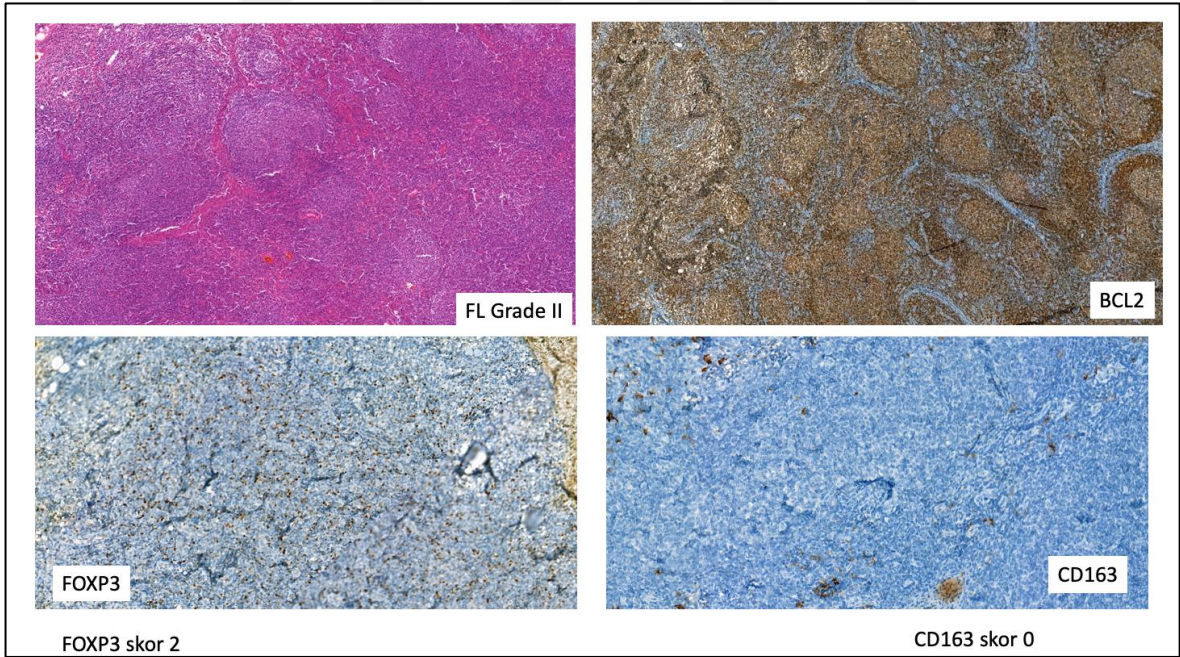
İmmünohistokimya testleri sonunda (Çizelge 5.1.) FOXP3 ve CD163 antikoları ile boyanan folliküler lenfoma olgularının ışık mikroskopik değerlendirilmesi ve skorlanmasında, FOXP3 pozitif Treg Skor 1 grubundaki hastalar tüm hastaların %38,1'ini (n=8), skor 2 grubundaki hastalar tüm hastaların %52,4'ünü (n=11) ve skor 3 grubundaki hastalar tüm hastaların %9,5'ini (n=2) oluşturmaktadır. CD163 ifade eden TİM'lerin değerlendirme sonuçları Skor 0 grubundaki hastalar tüm hastaların %66,7'sini (n=14), skor 1 grubundaki hastalar tüm hastaların %19'unu (n=4) ve skor 2 grubundaki hastalar tüm hastaların %14,3'ünü (n=3) oluşturmaktadır (Şekil 5.1-3.).

Çizelge 5.1. Demografik, klinik ve immunohistokimyasal bulgular.

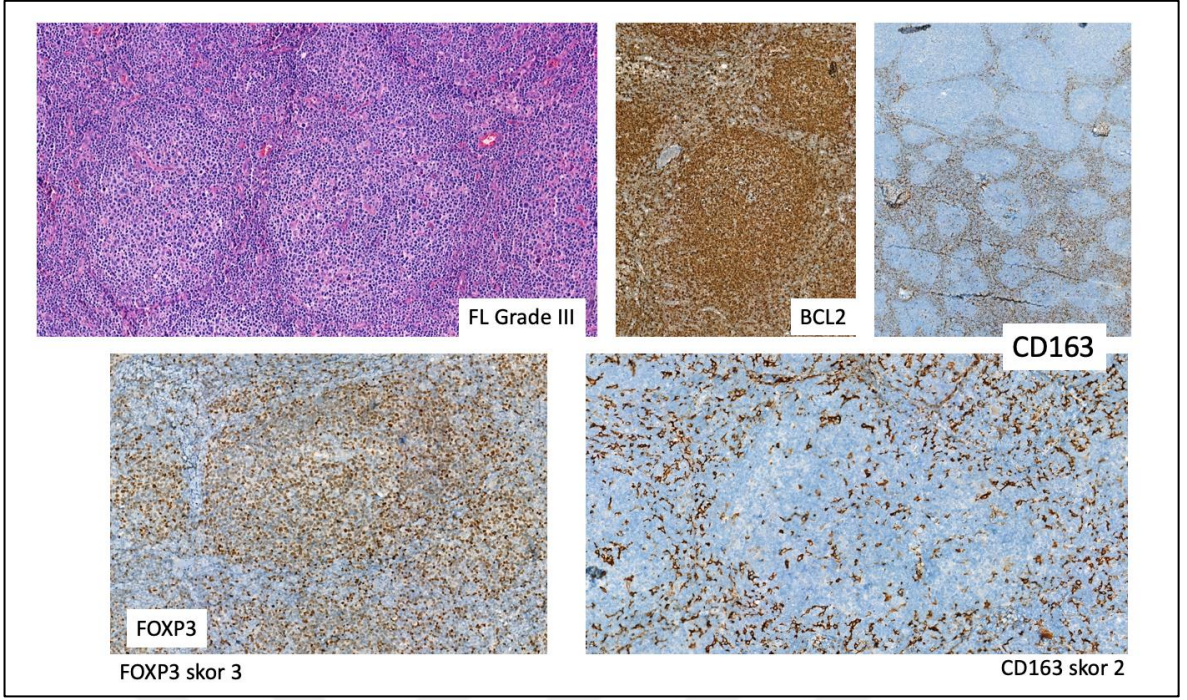
	Yaş	Cinsiyet	Grade	FOXP3	CD163	Hemogloblin	Serum LDH	Evre	Lenf nodu sayısı	Kİ Tutulumu	FLIPI-1 Skor	Kİ67	BCL2
Hasta 1	47	Erkek	1	2	1	16,6	225	1	<4	Yok	1	1	1
Hasta 2	55	Erkek	1	1	0	14,4	241	4	≥4	Yok	3	1	1
Hasta 3	66	Erkek	2	2	0	15,7	219	4B	≥4	Var	4	0	1
Hasta 4	56	Kadın	2	2	0	11,5	162	4	≥4	Var	3	0	1
Hasta 5	37	Erkek	2	1	0	15,5	154	4	≥4	Var	3	1	0
Hasta 6	74	Kadın	2	2	0	12,9	146	4	≥4	Var	3	2	1
Hasta 7	64	Kadın	2	1	1	12,8	380	4	≥4	Var	4	1	1
Hasta 8	59	Kadın	2	1	2	13,3	132	4	≥4	Yok	2	0	2
Hasta 9	73	Erkek	2	1	0	11,5	166	4	≥4	Var	4	2	1
Hasta 10	60	Kadın	2	1	0	14,0	0	4	≥4	Var	3	0	2
Hasta 11	66	Kadın	2	1	0	12,7	170	4	≥4	Var	3	2	1
Hasta 12	73	Kadın	2	2	0	14,6	230	3	≥4	Yok	4	2	1
Hasta 13	79	Erkek	2	2	0	12,4	256	3	≥4	Yok	4	1	0
Hasta 14	43	Kadın	2	2	0	12,5	150	3A	≥4	Yok	2	2	2
Hasta 15	33	Erkek	2	2	0	17,0	158	1	≥4	Yok	2	2	1
Hasta 16	51	Kadın	2	2	1	11,0	189	1	≥4	Var	3	1	1
Hasta 17	69	Erkek	2	2	0	16,5	210	4	≥4	Var	3	3	1
Hasta 18	75	Kadın	2	2	1	10,2	218	4	≥4	Var	5	1	2
Hasta 19	67	Erkek	2	1	2	15,9	146	3	≥4	Yok	3	3	1
Hasta 20	70	Erkek	3B	3	2	8,9	387	4	≥4	Var	5	3	2
Hasta 21	61	Erkek	3A	3	0	11,3	369	3	≥4	Yok	4	3	1



Şekil 5.1. FL grade II vakalarda skor 1 FOXP3, skor 0 CD163 ve BCL2 mikroskop görüntüleri.



Şekil 5.2. FL grade II vakalarda skor 2 FOXP3, skor 0 CD163 ve BCL2 mikroskop görüntüleri.



Şekil 5.3. FL grade III vakalarda skor 3 FOXP3, Skor 2 CD163, BCL2 mikroskop görüntüleri.

5.3. KLİNİK BULGULAR

Hastaların tanı sırasındaki evreleri değerlendirildiğinde, %9,5'i evre I (n=2), %23,8'i evre III (n=5), %61,9'u evre IV (n=13) olduğu saptanmıştır. Lenf nodu sayıları değerlendirildiğinde, 4'ten az sayıda lenf nodu tutulumu olan 1 hasta (%4,8) mevcutken, diğer hastaların (%95,2, n=20) 4 ve üzeri sayıda lenf nodu tutulumu gösterdiği saptanmaktadır. Kemik iliği tutulumu 12 hastada (%57,1) saptanmış, 9 hastada (%42,9) kemik iliği tutulumu bulunmadığı görülmüştür.

Hemoglobin değerleri 6 hastada normalin (12g/dL) altında gözlenirken, 15 hastada normal bulunmaktadır. Serum LDH değeri de 6 hastada normal seviyeden (200U/I) yüksek, 15 hastada normal sınırlarda gözlenmiştir.

Bu tez çalışmasına dahil olan FL vakalarının FLIPI skorları değerlendirildiğinde, 2 vakada düşük risk (0-1) saptanırken, 2 vakada orta risk (2), 17 vakanın ise yüksek risk grubunda (3-5) olduğu saptanmıştır.

Bu tez çalışmasında 2 vaka haricinde, bütün vakaların %90,5' inde BCL2 pozitifliği gözlenmiştir (Şekil 5.1-3.). BCL6 ifadesi ise bütün vakalarda bulunmaktadır. Hastaların proliferasyon belirteci KI67 durumlarına bakıldığında, 4 hastada (%19) proliferasyon oranının çok düşük (Skor 0), 7 hastada (%33,3) düşük (Skor 1), 6 hastada (%28,6) orta (Skor 2) ve 4 hastada (%19) (Skor 3) yüksek olduğu gözlenmiştir (Çizelge 5.1).

5.4. LMD VE RNA İZOLASYON SONUÇLARI

Lazer mikrodiseksiyon ile seçilen alanlardan yapılan RNA izolasyonları sonucunda (Çizelge 5.2), örneklerin saflıkları ve konsantrasyonları çalışmaya devam etmek için yeterli bulunmuştur.

Çizelge 5.2. LMD ile seçilen toplam alan, RNA konsantrasyon ve saflık bilgileri

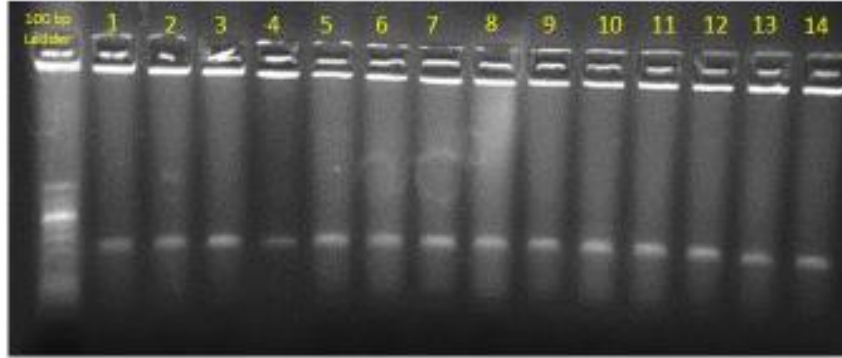
Örnek	Toplam Alan LCM (μm^2)	RNA Kons. (ng/ μl)	A260/280	A260/230
1	37392965	146	1.789	1.920
2	36149478	90	1.860	1.895
3	39017915	182	1.750	2.010
4	30495055	138	1.900	1.978
5	30888333	96	1.910	2.050
6	32674439	128	1.870	1.978
7	38447743	104	1.725	2.250
8	34314899	96	1.865	2.198
9	32543129	80	1.917	1.987
10	34179027	58	1.840	1.897
11	31649032	64	1.950	2.105
12	42165404	152	1.780	2.000
13	63835897	218	1.818	1.990
14	27806090	94	1.880	1.869
15	32196875	90	1.952	2.040
16	33276235	60	1.925	2.130
17	30963860	58	1.872	1.976
18	23594857	72	1.787	2.210
19	15543442	60	1.770	2.060
20	26482375	72	1.830	2.110
21	25291584	90	1.990	1.985
22	22675216	74	1.864	2.000
23	33141633	74	1.910	1.910
24	30450079	160	1.779	1.958
25	19466117	66	1.834	1.997
26	19731977	64	1.951	2.017
27	24141440	88	1.789	2.037
28	19814000	140	1.823	2.123
29	40138557	214	1.900	1.989
30	18425578	54	1.877	2.012

5.5. CDNA SENTEZİ VE OPTİMİZASYON SONUÇLARI

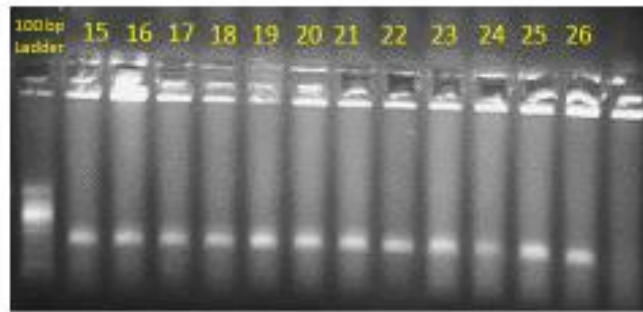
Sonuçları değerlendirmek amacıyla aynı RNA örneğinden iki farklı protokolde elde edilen cDNA örneklerinden, Beta-Actin house-keeping geni için 60°C bağlanma sıcaklığında 1:3, 1:4, 1:5 ve 1:10 seri dilüsyonlar kullanılarak PCR kurulmuştur. Reaksiyon sonrası elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Elde edilen sonuca göre 37°C'de 1 saat, 95°C'de 5 dakika inkübasyon şeklindeki protokolün daha başarılı olduğu gözlenmiştir (Jel görseli sunulmamıştır).

5.6. PCR OPTİMİZASYON SONUÇLARI

Hasta (n=21) ve kontrol grubundan (n=5) elde edilen cDNA örneklerinden 1:3 dilüsyon ile 60°C bağlanma sıcaklığı kullanılarak β -actin PCR reaksiyonu kurulmuştur. Yapılan PCR reaksiyonu sonucu elde edilen ampliconlar agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 5.4. ve 5.5.). Agaroz jel analizi sonucunda 1:3 dilüsyonun çalışmada kullanılmaya yeterli olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 5.4. cDNA örnekleri için yapılan Actin PCR ürünleri agaroz jel görüntüsü 1

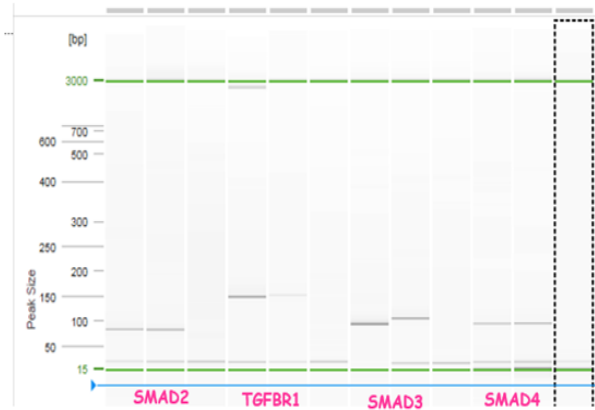


Şekil 5.5. cDNA örnekleri için yapılan Actin PCR ürünleri agaroz jel görüntüsü 2

Çalışmaya konu olan genlere ait primerler için gradient PCR denemeleri yapılmıştır. PCR analizleri sonucunda tüm primer setlerinin 60°C bağlanma sıcaklığında çalışabildiği anlaşılmıştır (jel görseli sunulmamıştır). Bağlanma sıcaklığı doğrulanan primerlerin görselini oluşturmak amacıyla 1 adet kontrol (1), 1 adet hasta (2) cDNA'sı kalıp olarak kullanılmış olup, Qiagen Qiaxcel kapiller jel elektroforezi sisteminde yürütülmüştür (Şekil 5.6 ve 5.7).



Şekil 5.6. CDKN2B, SMAD7, ZFYVE9, SMAD6 optimizasyon dijital jel görüntüsü (QIAxcel)

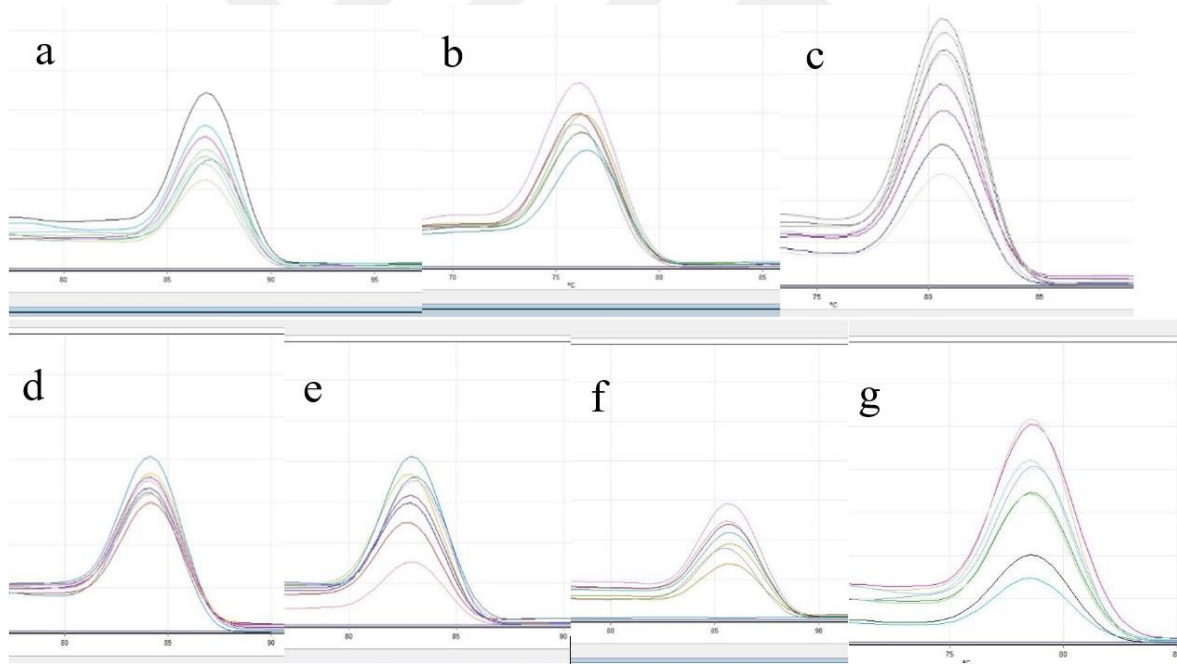


Şekil 5.7. SMAD2, TGF β R1, SMAD3, SMAD4 optimizasyon dijital jel görüntüsü (QIAxcel)

5.7. QRT-PCR OPTİMİZASYON SONUÇLARI

Konvensiyonel PCR reaksiyonu sonrasında tüm örnekler çalışma dilüsyonlarının belirlenebilmesi için RT-PCR reaksiyonuna tabi tutulmuştur. 1:2, 1:4, 1:5 ve 1:10 seri dilüsyonlar denenmiş olup, optimizasyonun tamamlanması için gerekli ön bilgilere sahip olunmuştur. cDNA miktarının en az 13ng/rxn olması gerektiği anlaşılmıştır.

Tüm primerlerin nonspesifik bant vermediğinden ve tek ürün oluşturduğundan emin olmak için PCR ürünlerine Melting Curve analizi yapılmıştır. Şekil 5.8’de melting curve analizi görselleri sunulmuştur. Alınan sonuca göre primer setleri hiçbir numunede nonspesifik bant oluşturmamış olup, elde edilen sıcaklık verileri, ürün kataloglarındaki değerler ile uyumlu bulunmuştur. Primer setleri eldeki vaka grubuna ait cDNA örneklerinde kullanılmaya uygundur.



Şekil 5.8. Melting curve eğrileri. a: Beta Actin geni, b: CDKN2B geni, c: SMAD2 geni, d: SMAD3 geni, e: SMAD4 geni , f: SMAD7 geni, g: TGFβR1 geni .

5.8. QRT-PCR SONUÇLARI

Kontrol ve FL grubunda TGF β R1, Smad2, Smad3, Smad4, Smad6, Smad7, SARA, CDKN2B genlerinin ifade düzeyleri (fold change) Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldığında FL grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Tüm grupta FOXP3 dereceleri ve gen ifade düzeyleri Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırılmıştır. Ancak istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Bu sonuç sadece FL grubunda FOXP3 dereceleri ve gen ifade düzeyleri karşılaştırıldığında da değişmemiştir.

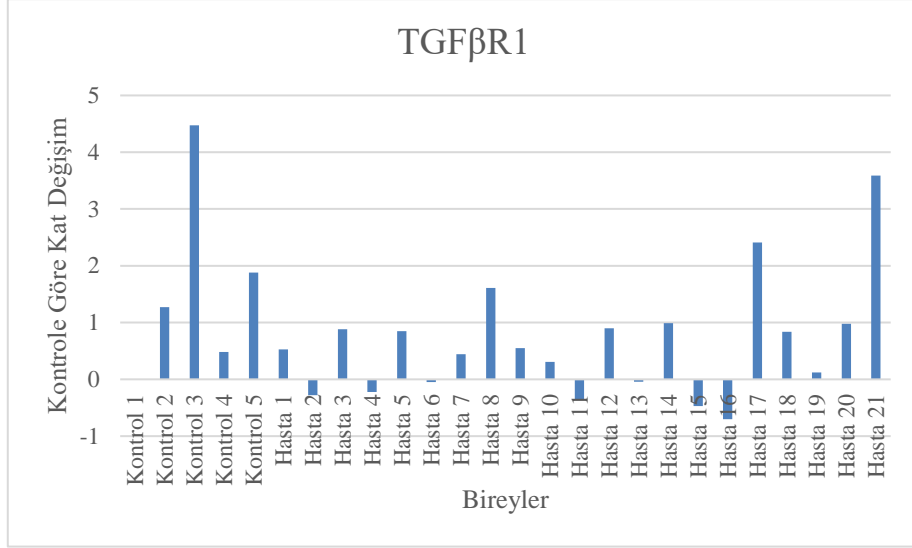
Tüm grupta CD163 dereceleri ile gen ifade düzeyleri Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırılmıştır. Ancak istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Bu sonuç sadece FL grubunda CD163 dereceleri ve gen ifade düzeyleri karşılaştırıldığında da anlamlı bir ilişki elde edilememiştir.

Spearman korelasyon katsayısı kullanılarak tüm grupta gen ifade düzeylerinin birbirleri ile korelasyonları araştırılmıştır. Bu teste göre, TGF β R1'in Smad2, Smad3, Smad4, SARA, CDKN2B ile arasında güçlü bir korelasyon olduğu gözlenmiştir ($p \leq 0,05$). Smad2'nin ise Smad3, Smad4, CDKN2B ile arasında güçlü bir korelasyon olduğu gözlenmiştir. Smad3'ün TGF β R1, Smad2, Smad4, Smad7, SARA, CDKN2B ile arasında güçlü bir korelasyon olduğu gözlenmiştir ($p \leq 0,05$). Smad4'ün TGF β R1, Smad2, Smad3, Smad7, SARA, CDKN2B ile arasında güçlü bir korelasyon olduğu gözlenmiştir ($p \leq 0,05$). Smad6'nın diğer genlerin hiçbiri ile korelasyon göstermediği gözlenmiştir. Smad7'nin Smad3, Smad4 ve SARA ile arasında güçlü bir korelasyon olduğu gözlenmiştir ($p \leq 0,05$). SARA'nın Smad3, Smad4 ve Smad7 ile arasında güçlü bir korelasyon olduğu gözlenmiştir ($p \leq 0,05$). CDKN2B'nin TGF β R1, Smad2, Smad3, Smad4 ile arasında güçlü bir korelasyon olduğu gözlenmiştir ($p \leq 0,05$).

QRT-PCR deneyleri sonucunda elde edilen ct değerleri Çizelge 5.3' te gösterilmiştir.

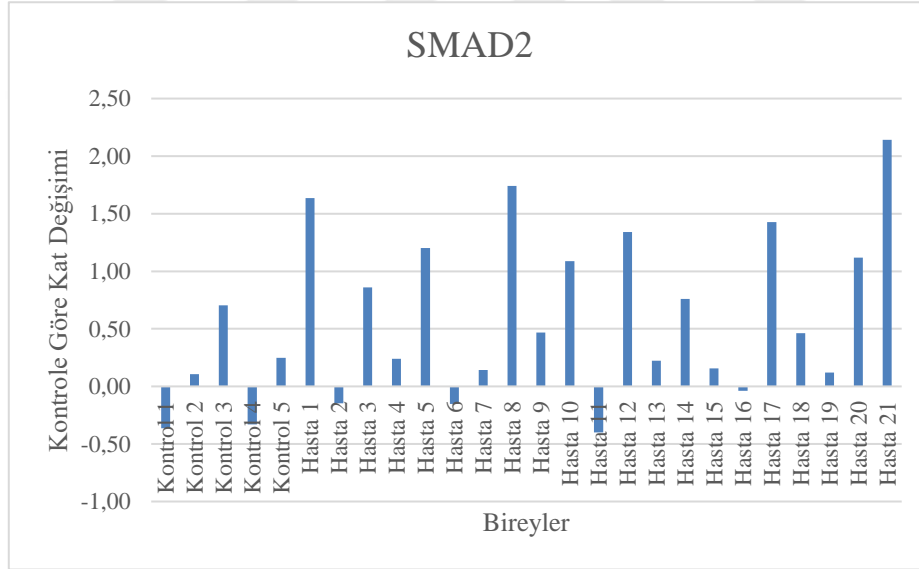
Çizelge 5.3. Örneklere ait ortalama CT değerlerini gösterir tablo (* Örnek 5 ve 14 Grade III vakalardır).

ÖRNEK	ACT1N	TGFβR1	SMAD2	SMAD3	SMAD4	SMAD6	SMAD7	SARA	CDKN2B
1	20,54	26,42	25,75	26,57	26,74	33,62	28,80	30,84	27,83
2	22,27	28,01	26,59	27,87	28,75	36,69	31,75	33,01	29,73
3	21,16	25,49	24,75	27,17	26,23	34,16	29,32	30,45	28,28
4	21,76	26,01	25,43	26,69	26,70	34,38	30,27	31,19	27,67
5	23,38	26,43	26,21	28,68	27,91	35,78	32,69	34,51	28,08
6	20,51	26,12	24,69	25,58	25,69	32,38	28,00	29,55	27,40
7	23,99	27,46	27,19	29,17	29,07	36,98	32,63	31,94	28,74
8	21,91	26,27	25,26	26,69	26,52	35,49	30,00	30,87	27,22
9	21,22	26,53	25,95	26,74	27,26	35,25	30,24	31,54	27,22
10	21,86	26,58	26,16	27,00	27,34	35,25	30,15	31,35	28,16
11	22,78	26,64	25,81	27,37	27,16	36,04	31,09	31,80	28,61
12	23,53	28,16	26,62	28,52	28,17	37,09	31,29	32,60	30,07
13	21,89	27,30	25,30	28,34	26,64	35,68	30,46	31,79	27,07
14	21,63	27,78	25,91	27,65	27,13	35,38	30,26	31,64	28,13
15	21,40	27,11	26,12	27,69	27,44	34,31	30,23	30,45	28,08
16	23,08	27,68	27,01	27,21	28,38	35,76	31,02	32,41	28,27
17	23,61	27,92	26,86	27,78	27,79	35,87	31,52	32,90	29,40
18	22,39	27,69	26,59	28,45	27,77	34,70	31,10	32,57	28,26
19	20,75	27,73	25,30	27,34	26,86	35,54	30,24	31,25	28,45
20	21,75	26,11	25,69	26,93	26,99	37,57	30,76	30,84	28,21
21	22,21	27,06	25,63	27,85	26,96	36,23	30,91	31,43	27,98
KONTROL	20,63	27,02	25,77	27,51	27,05	35,71	30,56	31,28	28,94
KONTROL	21,88	27,08	26,21	27,62	27,49	35,22	30,73	30,89	28,12
KONTROL	23,97	27,90	27,68	28,51	28,81	36,46	32,67	31,70	29,60
KONTROL	20,69	26,52	25,76	26,89	26,92	34,85	29,84	30,50	28,77
KONTROL	21,87	26,74	26,04	27,63	27,66	35,72	31,05	31,46	28,04



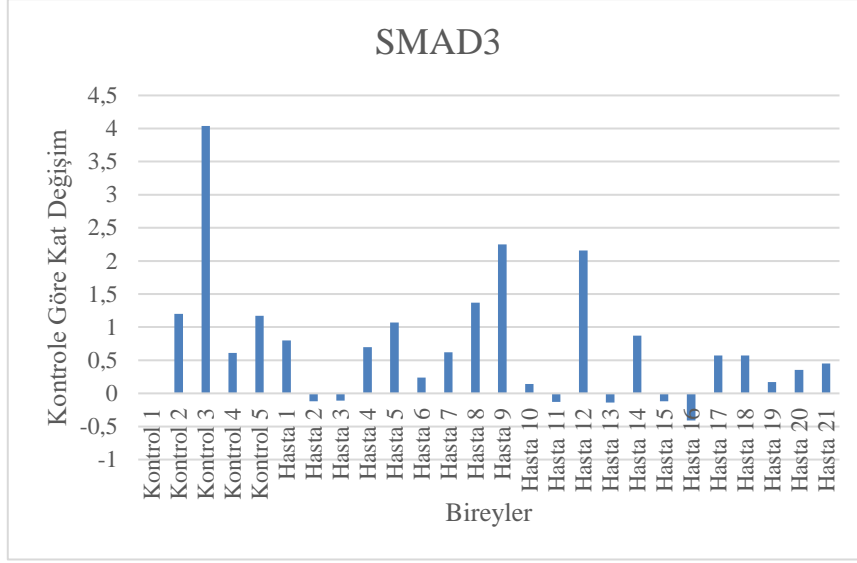
Şekil 5.9. TGFβR1 gen ifade değişimini gösterir grafik.

Bu tez çalışmasında 21 vakadan 14'ünde TGFβR1 gen ifadesinde artış tespit edilirken, 7 vakada TGFβR1 geninde ifadesinde düşüş gözlenmiştir (Şekil 5.9.). 20 ve 21 numaralı FL vakaları grade III vakalardır.



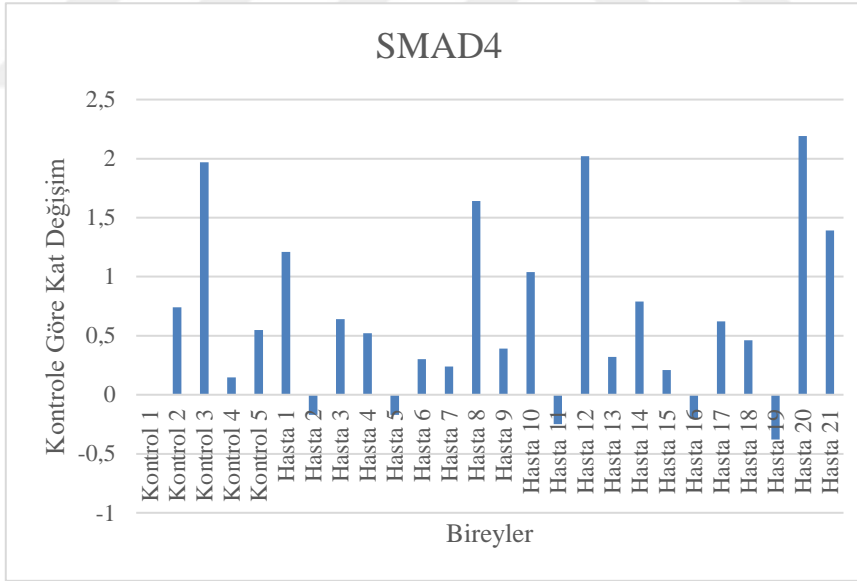
Şekil 5.10. SMAD2 gen ifade değişimini gösterir grafik.

Smad2 geni ifadesi 21 vakanın 17'sinde artış gösterirken, geriye kalan 4 vakada Smad2 gen ifadesinde düşüş saptanmıştır (Şekil 5.10.). 20 ve 21 numaralı FL vakaları grade III vakalardır.



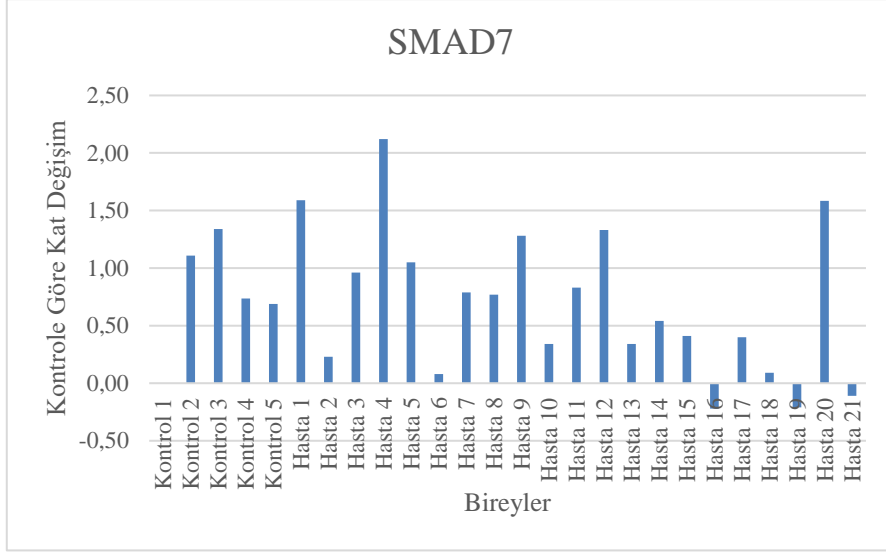
Şekil 5.11. SMAD3 gen ifade değişimini gösterir grafik.

Smad3 geni ifadesi 21 vakanın 15'inde artış gösterirken, geriye kalan 6 vakada Smad3 geni ifadesinde düşüş saptanmıştır (Şekil 5.11.). 20 ve 21 numaralı FL vakaları grade III vakalardır.



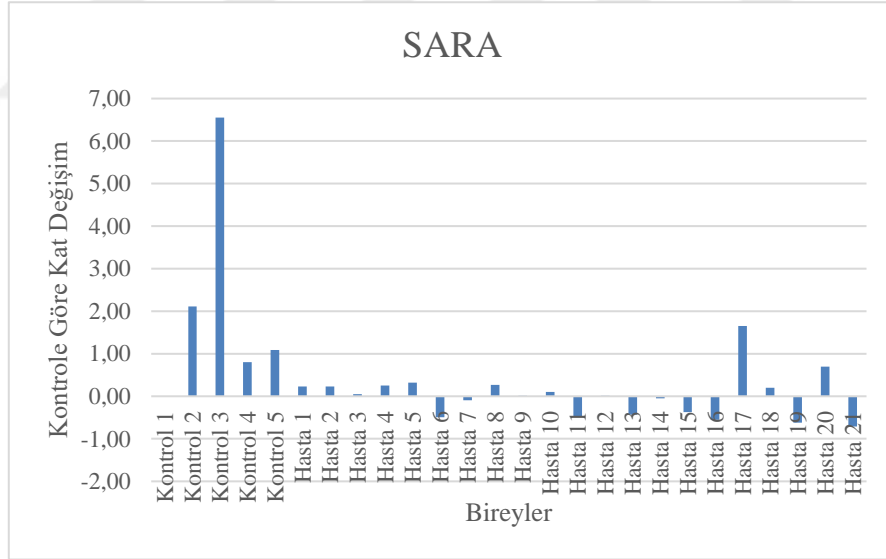
Şekil 5.12. SMAD4 gen ifade değişimini gösterir grafik.

Smad4 geni ifadesi 21 vakanın 16'sında artış gösterirken, geriye kalan 5 vakada Smad4 geni ifadesinde düşüş saptanmıştır (Şekil 5.12.). 20 ve 21 numaralı FL vakaları grade III vakalardır.



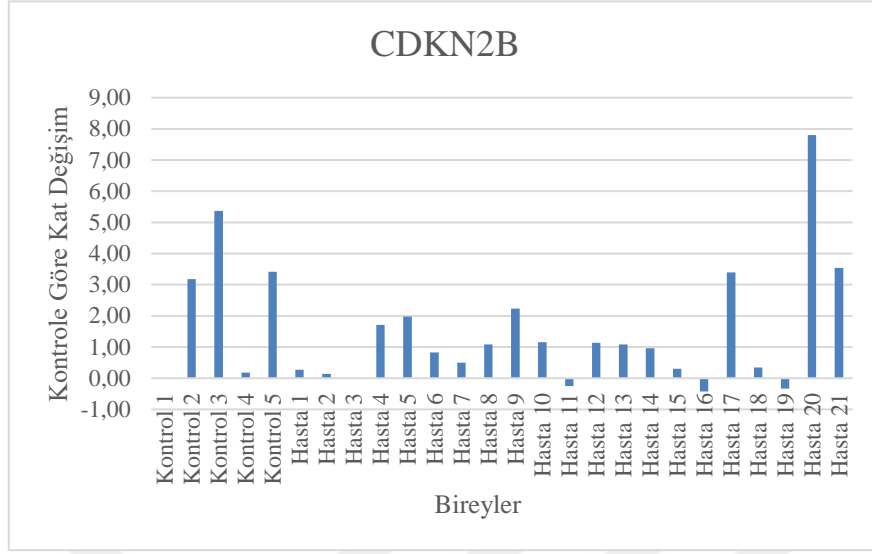
Şekil 5.13. SMAD7 gen ifade değişimini gösterir grafik.

Smad7 geni ifadesi 21 vakanın 18'inde artış gösterirken, geriye kalan 3 vakada Smad7 geni ifadesinde düşüş saptanmıştır (Şekil 5.13.). 20 ve 21 numaralı FL vakaları grade III vakalardır.



Şekil 5.14. SARA gen ifade değişimini gösterir grafik.

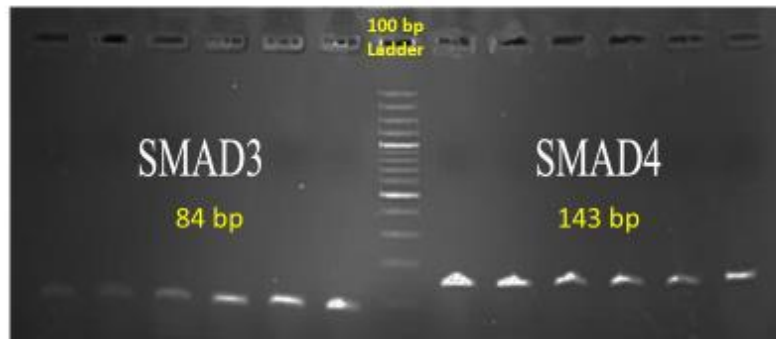
SARA geni ifadesi 21 vakanın 12'sinde anlamlı artış gösterirken, geriye kalan 9 vakada SARA geni ifadesi için düşüş saptanmıştır (Şekil 5.14.). 20 ve 21 numaralı FL vakaları grade III vakalardır.



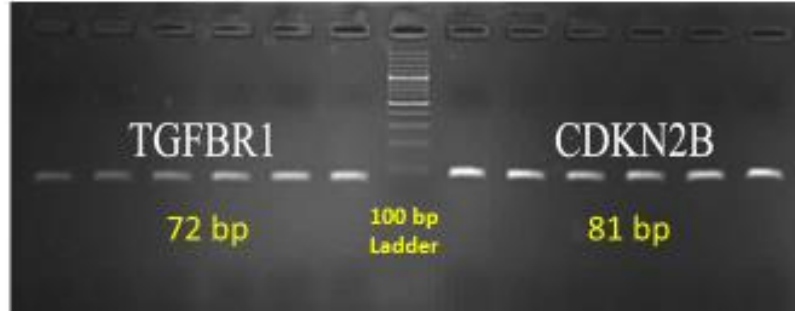
Şekil 5.15. CDKN2B gen ifade değişimini gösterir grafik.

CDKN2B gen ifadesi 21 vakanın 17'sinde artış gösterirken, 3 vakada CDKN2B gen ifadesinde düşüş saptanmıştır, 21 vakada ise ifade değişikliği saptanmamıştır (Şekil 5.15.). 20 ve 21 numaralı FL vakaları grade III vakalardır.

RT-PCR işlemi tamamlandıktan sonra, her gen bölgesi için rastgele örneklerden PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek amplifikasyonların non-spesifik bantlar olmaksızın gerçekleştiği doğrulanmıştır (Şekil 5.16.- 20.).



Şekil 5.16. Smad3 ve Smad4 reaksiyonlarına ait jel görüntüsü. DNA Ladder: Thermo Scientific SM0323



Şekil 5.17. TGF β R1 ve CDKN2B reaksiyonlarına ait jel görüntüsü. DNA Ladder: Thermo Scientific SM0323



Şekil 5.18. Smad7 ve Sara reaksiyonlarına ait jel görüntüsü. DNA Ladder: Thermo Scientific SM0323



Şekil 5.19. Smad6 reaksiyonlarına ait jel görüntüsü. DNA Ladder: Thermo Scientific SM0323



Şekil 5.20. Smad2 reaksiyonlarına ait jel görüntüsü. DNA Ladder: Thermo Scientific SM0323

5.9. İSTATİSTİK DEĞERLENDİRME SONUÇLARI

İstatistik analizlerde Mann Whitney U, Kruskal-Wallis, Fisher's Exact, Spearman korelasyon katsayısı metotları kullanılarak parametreler birbirleriyle karşılaştırılmıştır.

Bu analizlerden elde edilen sonuçlara göre; TGF β /Smad yolağında yer alan TGF β R1, Smad2, Smad3, Smad4, Smad6, Smad7, SARA ve CDKN2B gen ifadelerinin FL hastalarındaki değişimleri kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Çizelge 5.4, ($p \geq 0,05$)).

Çizelge 5.4. FL hastalarının TGF β /Smad yolağında yer alan gen ifade değişimlerinin kontrol grubu ile istatistiksel karşılaştırılması (Non parametrik Mann whitney U testi).

	TGF β R1	SMAD2	SMAD3	SMAD4	SMAD6	SMAD7	SARA	CDKN2B
P Değeri	0,555	0,242	0,492	0,242	0,555	0,184	0,753	0,492

FOXP3 ve CD163 immunhistokimyasal ifade skorlarına göre TGF β /Smad yolağındaki TGF β R1, Smad2, Smad3, Smad4, Smad6, Smad7, SARA, CDKN2B genlerinin ifadeleri arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır (Çizelge 5.5) ($p \geq 0,05$). Ayrıca KI67 proliferasyon indeksi ile TGF β /Smad yolağındaki TGF β R1, Smad2, Smad3, Smad4, Smad6, Smad7, SARA, CDKN2B genlerinin ifadeleri arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır (Çizelge 5.5) ($p \geq 0,05$).

Çizelge 5.5. İmmunhistokimyasal mikroçevre ilişkili belirteçler ve proliferasyon indeksi ile TGFβ/Smad yolağındaki genlerin ifadelerinin istatistiksel karşılaştırılması (Non parametrik Mann whitney U testi).

P değeri	TGFβR1	SMAD2	SMAD3	SMAD4	SMAD6	SMAD7	SARA	CDKN2B
FOXP3	0,952	0,952	0,952	0,952	1	1	0,952	1
CD163	0,913	0,913	0,913	0,913	0,913	0,913	0,913	0,913
Ki67	0,857	0,717	0,825	0,822	0,892	0,717	0,717	0,784

Klinik prognostik belirteç olan FLIPI skorları ile TGFβ/Smad yolağındaki TGFβR1, Smad2, Smad3, Smad4, Smad6, Smad7, SARA, CDKN2B genlerinin ifadeleri arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır (Çizelge 5.5) ($p \geq 0,05$). Hastalarda tanı sırasındaki evreleriyle ilgili bilgi veren kemik iliği tutulumu ile TGFβ/Smad yolağındaki TGFβR1, Smad2, Smad3, Smad4, Smad6, Smad7, SARA, CDKN2B genlerinin ifadeleri arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır (Çizelge 5.6) ($p \geq 0,05$).

Çizelge 5.6. FLIPI skorları, kemik iliği tutulumu ile TGFβ/Smad yolağındaki genlerin ifadelerinin istatistiksel karşılaştırılması (Non parametrik Mann whitney U testi).

P değeri	TGFβR1	SMAD2	SMAD3	SMAD4	SMAD6	SMAD7	SARA	CDKN2B
FLIPI Skor	0,292	0,248	0,248	0,248	0,547	0,406	0,406	1
Kemik İliği Tutulumu	0,936	0,936	0,936	0,936	0,972	0,936	0,936	0,972

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Foliküler lenfoma, germinal merkez B hücrelerinden kaynaklanan, hastalık seyri açısından çok fazla çeşitlilik gösteren batıda en sık rastlanan lenfoma tipidir. Foliküler lenfomanın klinik seyrinde etken olduğu bilinen yaş, evre, tümör yükü, kemik iliği tutulumu, sistemik semptomlar, performans durumu, serum laktat dehidrojenaz (LDH) ve hemoglobin düzeyleri, eritrosit sedimentasyon hızı ve β 2-mikroglobulin gibi klinik prognostik faktörlerle birlikte hastalık seyrinde tümör mikroçevresinin önemi anlaşılmaya başlamıştır. Neoplastik olmayan T hücreleri, makrofajlar, dendritik hücreler, fibroblastlar, endotel hücreleri gibi birçok hücreyi bulunduran tümör mikroçevresinde, Treg hücreleri ve makrofajların neoplastik süreçteki önemi dikkat çekmektedir (101).

Kanser gelişimi ve özellikle lenfomagenez senaryolarında rolü olduğu bilinen çok sayıda sinyal yolağı mevcuttur. Bu yolaklardan bir tanesi olan TGFB/Smad yolağı diğer yolaklardan farklı olarak kanser gelişimi ve progresyonunda pozitif ve negatif olmak üzere iki yönlü davranış paterni sergilemektedir (165). Bu durumun altında yattığı düşünülen sebeplerden biri, TGFB'nin, tümör mikroçevresinde bulunan hücrelerin üzerindeki farklı etkisinin, mikroçevrenin şekillenmesinde rol almasıdır.

TGFB, makrofajlar üzerindeki etkisi aracılığı ile $CD4^+$ T hücre proliferasyonunu baskılamak, T hücrelerinin farklılaşmasını ve fonksiyonlarını baskılamak, proliferasyon olmalarını ve etkinleşmelerini engeller (118). TGFB naif $CD4^+$ T hücrelerinin regülatör T hücrelerine farklılaşmasını sağlar (121). Ayrıca tümör mikroçevresindeki regülatör T hücreleri TGFB sitokinini salgılar ve $CD8^+$ T hücrelerinin baskılanmasına yol açar (119).

Düşük dereceli FL'ların klinik ve patolojik heterojenitesinin nedenlerinin anlaşılmasına dair birbiriyle çelişen sonuçlara sahip çalışmalar bulunmaktadır. Bu çelişkilerin sebebi düşük dereceli FL'larda klinik ve prognostik parametrelerin çeşitliliğini açıklayacak net faktörlerin bulunmamasıdır. Bu nedenle bu çalışmada düşük dereceli FL vakalarının klinik ve patolojik prognostik özellikleri ile mikroçevre durumuyla ilgili eksikliklerin tamamlanmasına yönelik bir çalışma planı yapılmıştır. Mikroçevrenin organizasyonunda TGFB/Smad yolağının önemi olabileceği hipotezi kurulmuştur. Çalışmanın omurgasını tümör mikroçevresi

oluşturduğu için neoplastik folliküllerin ayrılması ve diğer alanlardaki hücrelerin gen ifadelerinin sonuçları etkilememesi için lazer mikrodiseksiyon yöntemi tercih edilmiştir. Bu şekilde çalışma sonuçlarının güvenilirliğinin artırılması hedeflenmiştir.

Bu konudaki belirsizliklerin anlaşılmasına katkıda bulunma amacıyla yapılan bu tez çalışmasında, TGFB/Smad yolağının Treg hücreleri ve makrofajlar üzerinden folliküler lenfoma prognozuna mikroçevrenin etkisi incelenmiştir. Bu doğrultuda TGFβ/Smad yolağında yer alan genlerdeki ifade değişikliklerinin düşük dereceli Grade I ve II) FL prognozu üzerinde etkisinin incelenmiştir ve sonuca ulaşmak için planlanan teknik her adım başarı ile tamamlanmıştır.

6.1.1. TEKNİK DEĞERLENDİRME

Bu tez çalışmasının başlangıcında, folliküler lenfoma tanısı almış 25 hasta ve kontrol grubu olarak 5 reaktif hiperplazi örneği çalışmaya dahil edilmiştir. Ancak hasta parafine gömülü dokularının 4'ünden elde edilen RNA konsantrasyonları ve kaliteleri çalışmaya devam edecek yeterlilikte olmadığı için çalışma dışı bırakılmak zorunda kalınmıştır. Bu örneklerdeki başarısız sonuçların sebeplerinden biri dokunun FFPE patoloji örnekleri olmasından kaynaklanan RNA kaybı, ya da lazer mikrodiseksiyon işlemi sırasında meydana gelmiş olabilecek kayıplar olabileceği düşünülmektedir. Bu olumsuzlukların önüne geçilmesi için lazer mikrodiseksiyon ile dokudan alınan örnekler zaman kaybetmeksizin dondurularak saklanmıştır. Ayrıca elde edilecek RNA miktarını arttırmak için yapılan deneme sonucunda RNA izolasyonunun ilk aşaması olan proteinaz ile 56°C'de inkübasyon aşaması protokoldeki süreden uzatılarak gece boyu yapılmıştır. Ancak 4 hasta örneği için yine de başarısız sonuç elde edilmiştir. Bu nedenle çalışmaya 5'i kontrol olmak üzere 26 örnekle devam edilmiştir.

6.1.2. DEMOGRAFİK DEĞERLENDİRME

21 FL vakasının 11 'ini erkek bireyler oluştururken, 10'u kadın bireylerden oluşmaktadır. Literatürdeki bilgilere göre folliküler lenfoma erkek bireylerde kadınlara oranla 1,7 kat daha fazla ortaya çıkmaktadır (249).

Vakaların 12'si 60 yaşın üzerinde tanı almıştır. Dokuz vaka 37 ve 33 yaş gibi erken yaşlarda tanı almış hastalardır. Folliküler lenfoma için tanı yaşı ortalama 59'dur. Ancak erken yaşta tanı alan vakalara da az olmakla birlikte rastlanmaktadır (4). Bu çalışmadaki vakaların yaş ortalaması 64'tür. Literatüre göre yüksek olan bu yaş ortalaması aynı zamanda bir prognostik risk faktörünü de oluşturmaktadır. 60 yaş üzeri yaş FLIPI değerlendirmesine göre folliküler lenfomada hastalık seyri için negatif bir belirteçtir (73).

Hemoglobin seviyesinin normal seviyeden (12g/dL) düşük olması folliküler lenfoma hastaları için prognostik bir risk faktörüdür. Kemik iliği tutulumu ve kemik iliği yetmezliğine sebep olan hastalık varlığını desteklemektedir. Çalışmamızda 21 vakanın 6'sında (%28,5) hemoglobin düşük bulunmuştur.

Folliküler lenfomadaki prognostik risk faktörlerinden bir diğeri serum LDH (laktat dehidrojenaz) seviyesinin (200U/l) yüksek olmasıdır. Bu çalışmada 21 vakanın 11'inde (%52,3) LDH seviyesinin normalin üstünde olduğu görülmüştür. Bu durum risk faktörleri arasında düşük dereceli (Grade I-II) FL vakaların incelenmiş olmasına rağmen hastaların yarısında hastalığın yaygın olduğunu ortaya koymaktadır.

Çalışmaya dahil edilen FL vakalarından 3'ü erken evrede (evre 1) tanı almışken, geriye kalan 18'i ileri evrede (evre 3 ya da 4) tanı almışlardır. Hastalık evresinin ileri olması en önemli prognostik belirteçlerdendir (72).

325 folliküler lenfoma vakası ile yapılan bir çalışmada, tanı sırasında ileri evreli, yüksek FLIPI ve IPI skorlu hastalarda histolojik transformasyon riskinin çok daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. 15 yıllık takip sonucunda elde edilen sonuçlar, ileri yaş, düşük hemoglobin, yüksek LDH ve yüksek FLIPI-IPI skoru ilk nükste histolojik transformasyonla ilişkilendirilmiştir (1).

Bu tez çalışmasına dahil olan FL vakalarının FLIPI skorları değerlendirildiğinde, 2 vakada düşük risk (0-1) saptanırken, 2 vakada orta risk (2), 17 vakanın ise yüksek risk grubunda (3-5) olduğu saptanmıştır.

Çalışma kapsamında değerlendirilen bir diğere parametre KI-67 ile belirlenen proliferasyon durumudur. Yirmibir vakadan 11'inde KI-67 ifadesi düşük ya da hiç yokken, geriye kalan 10 vakada KI-67 ile proliferasyon indeksi yüksek gözlenmiştir. Neoplastik follikül

hücrelerinde mitoz oranı genel olarak reaktif folliküllere göre daha düşüktür. KI-67 değerlendirmesi bu açıdan önemlidir. Bazı çalışmalarda, FL vakalarının bir kısmında yüksek KI-67 ifadesi olduğu bilinmektedir. Bu vakaların daha agresif davranış gösterdikleri bildirilmiştir (27,28).

T(14;18) translokasyonundan dolayı BCL2 ifadesi artışı folliküler lenfoma hastalarının %85-90'ında görülür. Bu tez çalışmasında 2 vaka haricinde yani bütün vakaların %90,5'inde BCL2 pozitifliği gözlenmiştir. Tanı kriterlerinden biri olduğundan dolayı bu durum şaşırtıcı değildir.

6.1.3. İMMUNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

21'i FL örneği olan 26 adet FFPE dokudan immünohistokimya ile Treg hücrelerin mikroçevredeki yoğunluğunun incelenmesi için FOXP3 ve tümör ilişkili makrofajların mikroçevredeki yoğunluğu için CD163 immunhistokimyasal olarak incelenmiştir. Sonuçlara göre FOXP3 için 21 hasta örneğinden 8'inde (%38,1) düşük skorlu, 11'inde (%52,4) orta skorlu, 2'sinde (%9,5) yüksek skorlu boyanma olduğu gözlenmiştir. CD163 boyama sonuçları ise; hastaların 14'ünde (%66,7) düşük seviyede boyanma, 4'ünde (%19) orta seviyede boyanma, 3'ünde (%14,3) yüksek seviyede boyanma gözlenmiştir. Bu oranlara bakılarak tümör ilişkili makrofajların yoğunluğunun genel olarak düşük olduğu saptanmıştır.

Bu skorların grade I-II ile grade III vakalar arasında nasıl değişiklik gösterdiğini incelediğimizde, FOXP3 için yüksek skorlu iki vakanın ikisinin de grade III vakası olduğu göze çarpmaktadır. Bu iki grade III vakasının CD163 skorlarına bakıldığında, iki vakadan birinin skorunun yüksek olduğu dikkat çekmektedir. Bu durumun dikkat çekmesinin sebebi 21 vakadan sadece 3'ünün CD163 skorunun yüksek olması ve bunlardan birinin de grade III vakası olmasıdır. Bu durum, yüksek dereceli FL vakalarının mikroçevrelerinde, düşük dereceli olanlarla karşılaştırıldığında daha yoğun Treg ve tümör ilişkili makrofaj bulunduğu dair bir gösterge olabilir. FOXP3 ve CD163 ifadesi açısından iki ayrı grup bulunacağı beklenmiş, ancak genel olarak FOXP3 ifadesi yüksek, CD163 açısından fakir bir mikroçevre olduğu saptanmıştır. Bu değerler çalışmadaki diğer prognostik ve moleküler parametreler ile karşılaştırıldığında herhangi bir grupta istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir (p=0,952-1). Ancak vaka bazında değerlendirme yapıldığında, en yüksek FOXP3 pozitif Treg yoğunluğu gösteren skor 3 bulunan iki vakanın ikisinin de grade III

olması dikkat çekmektedir. Ayrıca bu iki vakanın birinde CD163 skorunun da 2 olduğu tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında hipotezde düşük dereceli (grade I-II) FL vakalar hedeflenmiştir. Literatürde Grade III FL ile Grade I-II FL' lar prognostik ve moleküler yolakların farklılığı açısından zaten birbirinden farklıdır. Bu nedenle FOXP3 ve CD163 skorları yüksek olması beklenen bir sonuçtur (139,152).

İki Grade III vakanın TGF β /Smad yolağındaki gen ifade değişimleri incelendiğinde bu vakalardan birinin TGFBR1 gen ifadesinde düşüş saptanan vakalardan biri olduğu göze çarpmaktadır. Burada dikkat çeken diğer bir durum ise, bu vakada yolaktaki diğer genlerin ifadelerinde de anlamlı bir düşüş ya da artış saptanmamış olmasıdır. Bu iki Grade III vakadan diğerinde ise Grade I ve II vakalardan ayrı bir gen ifade paterni saptanmamıştır. Bu tez çalışmasının asıl hedefi düşük dereceli FL vakaları olduğundan, grade III vakalarının sayısı sınırlı olmuştur. Ancak düşük ve yüksek dereceli FL vakaları arasında bir karşılaştırma hedeflenmiş olsaydı, sınırlı sayıdaki vakaya rağmen saptamış olduğumuz bu farkın daha belirgin hale gelecek olduğunu düşündürmüştür.

Literatürde, Treg hücreleri ve makrofajların lenfomaların prognozu, tedavi seçenekleri üzerindeki etkisi hakkında farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Son zamanlarda gen ifade analiz çalışmalarından ortaya çıkan bilgiler ışığında folliküler lenfoma ve DBBHL'de malign olmayan lenfositlerin çok önemli prognostik anlam taşıdıklarını göstermiştir (6). Sağlıklı bireyler ya da tedavisinin tamamlamış bireylere kıyasla tedavi almamış B-NHL hastalarında FOXP3 mRNA transkriptlerinin önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir. Serum LDH ve periferik CD4/CD25 pozitifliği arasında, periferik kan FOXP3 ifadesi, hastalık evresi ile hastaların performans durumu arasında, periferik kan TGF β mRNA ifadesi ile CD4/CD25 arasında, periferik kan TGF β ifadesi, hastalık evresi ve performans durumu arasında pozitif bir korelasyon saptanmıştır. FL hastalarında diğer gruplara göre, LDH ve FOXP3 ifadesinin daha yüksek olduğu ortaya çıkmıştır (250). Laurenti ve arkadaşları, Treg popülasyonunun LDH seviyesiyle ilişkili olduğunu gösterdiler. Artmış Treg oranını yüksek LDH ile ilişkilendirmişlerdir (251). Bu tez çalışmasında FOXP3 değerleri ile prognostik faktörlerinin hiçbiri arasında bir korelasyon saptanmamıştır.

FOXP3⁺ Treg'in hastalık nüksünde de rolü olduğuna dair sonuçlar Malpeli ve arkadaşlarının 2018 yılındaki çalışmalarında ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada, 26 FL ve 12 reaktif lenf nodunda microarray ile microRNA ifade profili ve immünohistokimya ile de tümör mikroçevresi araştırılmıştır. FOXP3⁺ hücreler nüks eden hastalarda önemli ölçüde daha düşük bulunurken, düşük FOXP3⁺ hücre sayısı hastalığın daha kısa sürede nüks etmesi ile ilişkilendirilmiştir ve FOXP3⁺ hücrelerin hastalık nüksünde bir belirteç olabileceğini göstermiştir (252).

FOXP3⁺ Treglerin mikroçevredeki etkilerinin yanı sıra, tanı anındaki lokalizasyonlarının transformasyonla ilgili ip uçları verebileceği öne sürülmüştür. Bu hücrelerin tanıda follikül dışında yer alması daha kısa sürede transformasyona işaret etmektedir. Ayrıca FOXP3⁺ Treglerin yüksek total alan skorları lokalizasyondan bağımsız olarak daha kısa sürede transformasyon ile korelasyon içerisinde olduğu gösterilmiştir. FOXP3⁺ Treglerin lokalizasyona göre farklı roller üstenebilecekleri keşfedilmiştir; follikül içinde tümör gelişimini destekleyen CD4⁺ Tfh hücrelerini baskımlarken, follikül dışında tümör baskılayıcı T hücre alt sınıflarının baskılanmasına sebep olabildiği bilgisi elde edilmiştir (162).

Tanı esnasında folliküler FOXP3⁺ Treg'in yüksek miktarının, rituximab çağından önce folliküler lenfomada genel sağkalım süresini uzattığı sonucu elde edilmiştir (162,253).

Farklı T hücre tipleri arasındaki denge, FL'de kontrol noktası inhibitörleri gibi yeni tedavilerin öneminin arttığını kanıtlayabilir.

Mayo Clinic grubunun, NHL B hücrelerini kullandıkları bir in vitro çalışmada, tümör içi alanda Treg hücrelerinin aktive olmuş infiltre olan sitotoksik CD8⁺ T hücrelerinin proliferasyonunu ve granül üretimini engellediğini gösterdiler. B hücrelerine maruz kalan infiltre sitotoksik CD8⁺ T hücrelerinin sitotoksik granül üretmediğini ve bu durumu takiben sitotoksik aktivitesinin, tümör içi Treg hücrelerinin varlığında tamamen zayıflatıldığını gösterdiler. Bununla birlikte, B hücreli NHL hastalarından alınan biyopsi örneklerinde tümör içi Treg hücrelerinin sayısının arttığını da gösterdiler (141).

Hematopoetik olmayan kanserlerde sonuçlar çelişkili olsa da, geçmişe dönük birçok çalışmada FOXP3⁺ T hücrelerinin; FL'de, germinal merkez tipi DBBHL'de, Hodgkin lenfomada tedaviden bağımsız iyi prognoza işaret olduğunu gösterdiler (142,254). Ancak

germinal merkez tipi olmayan DBBHL'de FOXP3⁺ T hücreleri kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (46).

Ayrıca, heterojen tedavinin klinik etkisi ile ilgili çelişkili sonuçlar zaman zaman ortaya çıkmaktadır (255).

Literatürdeki çalışmalardan elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında FOXP3⁺ Treg ve lenfoma arasındaki ilişkinin hala tartışmalı olduğu görülmektedir. Bazı çalışmalarda Treg hücreleri ile prognoz arasında pozitif ilişki kurulurken, bazılarında tam tersidir. Farklı lenfoma tipleri ve hematolojik olmayan tümörlerden farklı sonuçlar elde edilmiştir (138). Bu tartışmalı sonuçların sebeplerinin şunlar olabileceği düşünülmektedir;

1. Treg değerlendirmesinde kullanılan metotların heterojenitesi
2. Anti-FOXP3 antikor spesifitesindeki farklılıklar
3. Alt ve üst sınır değerlerinin belirlenmesi
4. Analiz için tümör alanın seçimi (139).

Yapılan çalışmalar, tümör mikroçevresinin detaylı bir karakterizasyonu ile yeni immünoterapötik ajanlar, kontrol noktası inhibitörleri, idealisib gibi sinyal yolak inhibitörleri tedavilerinin yanıtı için farklı T hücre tiplerinin kompozisyonunun önemini göstermektedir (162).

Bu tez çalışmasında CD163⁺ pozitifliği ile diğer klinik ve moleküler parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir korelasyon saptanmamıştır. Folliküler lenfomalarda CD163 ifade eden makrofajların sayıca artışının prognostik önemini araştıran klinik çalışmaların vaka serilerinin tekrar değerlendirilmesinde makrofaj artışının ancak kullanılan tedaviyle ilişkili bir prognostik önemi olduğu anlaşılmıştır (210). Bu çalışma vakalarından ikisi yüksek dereceli Grade III FL vakası, diğerleri düşük dereceli (FL Grade I veya II) vakalarıdır. Düşük dereceli FL vakalarında çok düşük makrofaj sayısı bulunurken 2 Grade III FL vakasında diğerlerinden daha yüksek makrofaj izlenmiştir. CD163 ile makrofajların yüksek bulunmamasının serideki en önemli sebebi çalışmada düşük dereceli FL vakalarının bulunmasıdır.

6.1.4. QPCR DEĞERLENDİRME

Bu tez çalışmasında 21 vakadan 14'ünde TGFβR1 gen ifadesinde kontrole göre artış tespit edilirken, 7 vakada TGFβR1 geninde ifadesinde düşüş gözlenmiştir. İfade düşüşü olan vakaların ifadesi yükselen vakalardan farklı olarak tanı anında erken evre oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca düşük ifadeye sahip olan vakaların yaşlarının da ortalamanın altında olması dikkat çekmektedir. Bununla beraber erken evre bir başka vakada ifade artışı gözlenmiştir. İstatistiksel olarak da evre ile TGFβR1 ifadesi arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır. Hematopoetik hastalıkların birçok çeşidinde, neoplastik hücrelerin sınırsızca proliferasyonuna sebep olan TGFβ aktivitesine karşı duyarlılıkta kayıplar gözlenmiştir (231).

Bu olasılığın düşünülmesindeki diğer neden de bu çalışma kapsamında ifadesi değerlendirilen diğer TGFβ/Smad yolağındaki transkripsiyon faktörleri olan Smad2, Smad3 ve Smad4'ün folliküler lenfoma hastalarındaki ifade değişikliğinin benzer patern göstermesidir. Smad2 geninin ifadesinde 21 vakanın 17'sinde, Smad3 geninin ifadesinde 21 vakanın 15'inde ve Smad4 geninin ifadesinde 21 vakanın 16'sında artış gözlenirken, geriye kalan vakalarda bu genlerin ifadesinde düşüş saptanmıştır. Çalışmamızı oluşturan vakaların çoğunluğunun ileri evrede tanı aldıkları düşünüldüğünde, TGFβ/Smad yolağı elemanlarının genel olarak düşük seviyede ifadesi beklenir. Çünkü bu yolağın hedef genleri arasında bulunan CDKN2B ve CDKN1A genleri hücre siklusunu durdurarak proliferasyonu ve dolayısıyla tümör oluşumunu baskırlar. Buradaki gen ifadelerinin yüksekliğine rağmen FLIPI skorlarının yüksekliği, başka hücresel ve genomik mekanizmalar ile transkriptlerin işlevsel proteinlere dönüşmesinin engellendiği fikrini doğurmaktadır. Posttranslasyonel süreçler (ubikitinasyon, sumoylasyon gibi), epigenetik mekanizmalar, örneğin; mikroRNAlar ya da yolaktaki diğer unsurlarda meydana gelmiş olabilecek mutasyonlar gibi değişiklikler bu sonuca yol açmış olabilir.

Birçok lenfoma ve lösemi tanı grubunda tümör hücrelerinin hiçbir düzenleyici etkisi olmamasına rağmen TGFβ1 üretmeye devam ettiği bilinmektedir (232,256). Ancak bu tepkisizleşme sürecinin altında yatan sebepler netlik kazanmamıştır. Bu noktada ilk akla gelen senaryolardan biri yolaktaki sinyal iletimini olumsuz etkileyecek başka faktörlerin devreye girmesidir. Örneğin inhibitör Smadlar, reseptör Smadların, co-Smad Smad4 ile

kompleks oluşturup sinyalin iletimine engel olabilmektedir. Bu çalışmada iki inhibitör Smad olan Smad6 ve Smad7 geninin FL vakalarında ve kontrollerde ifade düzeyleri incelenmiştir. Ancak Smad6 geninin amplifikasyonu kontrol ve hasta grubunda da yeteri kadar gerçekleşmediği için değerlendirme dışında bırakılmıştır. Smad7 geninin ifadesi ise 21 vakadan 18'inde artış gösterirken, geri kalan 3 vakada bu gen için ifade düşüşü saptanmıştır. Smad7 ifadesinin arttığı vakalar patern olarak TGFβR1 ifadesinin arttığı vakalarla büyük ölçüde örtüşmektedir. Bu durum da TGFβR1'in tümör baskılayıcı etkisinin Smad7 tarafından inhibe edilmiş olma olasılığını düşündürmektedir. Smad6 BMP sinyalini inhibe ederken, Smad7 hem TGFβ hem BMP sinyalini baskılar (229,257). İmmün sistem kökenli hücrelerin çoğalması ve gerektiğinde ortadan kaldırılmasında etkili bir regülatör görev üstlenen TGFβ1'in üretimi olmasına rağmen bu düzenleyici etkisini kaybetmesinin arkasında çeşitli senaryolar olabilir (231). Sonuç olarak lenfomagenezde TGFβ/Smad yolağının rolü olduğu bilinmesine rağmen başka birçok kompleks mekanizma da bu süreçte devreye girmektedir (165).

İmmün sistemin bir denge halinde tutulması için lenfoid hücrelerin proliferasyon, matürasyon, aktivasyon ve eliminasyonunun kontrolü sağlanması çok büyük bir öneme sahiptir (229). İmmün sistemin stabilizasyonundaki en temel süreç apoptozistir. Bu sayede otoreaktif lenfositler ortadan kaldırılarak immün yanıt ile hücre miktarı kontrol altında tutulabilmektedir.

TGFβ1 normal lenfoid hücrelerde anti-proliferatif ve pro-apoptotik aktivitesi ile bu sürecin bir parçasıdır (230).

TGFB'nın lenfoma gelişimindeki rolü, TGFB1'den yoksun farelerde lenfositlerin yoğun bir proliferasyon sürecine girmesi ile desteklenmiştir. Hematopoetik malignitelerin birçok çeşidinde TGFB aktivitesine karşı duyarlılık kaybolmuştur. Bu durum da neoplastik hücrelerin sınırsızca artmasına sebep olmuştur (258). TGFB1'in antiproliferatif ve/veya proapoptotik etkisi lenfomagenezde önemli inhibitör faktör olabilir. Ancak endojen TGFB üretimine rağmen birçok örnekte inhibitör etki gösterememektedir. Bunun sebeplerinden biri otokrin TGFB1 aktivasyonunun gerçekleşmemesi ya da aktive edilmiş hücre içi sinyal yolakların-da olası bir bozukluğu ve böylece proapoptotik endojen TGFB'nın lenfoma

hücrelerinde I-Smadların ifadesi ve sağ kalım faktörleri tarafından baskılandığını düşündürmektedir.

HT58 lenfoma hücre hattında TGF β R1 tarafından hedeflenen birçok hücre döngüsü regülatör geninin (ÖR; p15, p16, CyclinD1) ekzojen TGF β R1 muamelesinden sonra değişmediğini göstermiştir (231).

Bu tez çalışmasında da TGFB1 ifade değişimi ile p15 (CDKN2B) ifadesi arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır.

60 FL hastası ve 20 kontrol örneğinin dahil edildiği bir çalışmada, IL-IR α , IL-6, IL-7, IL-10, IL-13, TNF- α , VEGF, PDGF, b-FGF ve TGF β sitokinlerinin serum seviyesinin prognostik etkisi değerlendirilmiştir. FL hastalarında IL-IR α , IL-6, IL-7, IL-10, IL-13, TNF- α , VEGF, PDGF seviyelerinin arttığı gözlenmiştir. Çeşitli analizler sonucunda, TGF β ve erken evrenin genel sağ kalım ile pozitif bir ilişki içinde olduğu gösterilmiştir. Yüksek LDH ve VEGF seviyeleri birbirlerinden bağımsız olarak kısa ilerlemesiz sağ kalımla ilişkilendirilmiştir (259).

Son çalışmalardan bazıları, FL gelişiminde TGF β yolağının etkin olduğunu gösterdiler. Tvrdik ve arkadaşları, FL hücre hattı DoHH2'de çalışarak, TGF β 'nın in vitro etkilerini araştırmış ve hücre siklusunu blokladığını göstermişlerdir (260,261).

Husson ve arkadaşları (32), gen ifade profil çalışmasında, FL'de normal germinal merkez B hücrelerine kıyasla en fazla ifadesi artan genin Smad1 olduğunu gösterdiler. Huse ve arkadaşları, TGF β 'nın, DBBHL'yı da içeren diğer B hücreli lenfoma hücre hatlarında böyle bir etkisi yokken, FL hücre hatlarında proliferasyonu baskıladığını gösterdiler (262). Bunların hepsi göz önüne alındığında, bu in vivo ve in vitro çalışmalar TGF β 'nın FL hücre proliferasyonundaki negatif etkisini göstermektedir. Bu da yüksek serum TGF β seviyesinin FL hastalarına faydasını açıklamaktadır (259). Bizim bulgularımıza göre yüksek proliferasyon gösteren 4 vakada (Kİ67 skoru 3) gen ifadesi değişimlerinde, düşük veya orta proliferasyonlu vakalara (Kİ67 skoru 1 ya da 2) göre anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Normal germinal merkez B hücreleri ve FL hücrelerinin ifade ettikleri genleri incelemek için cDNA arrayleri ile yapılan bir çalışmada FL B hücrelerinde, normal germinal merkez B hücreleriyle karşılaştırıldığında 37 genin ifadesinin arttığı, 28 genin ifadesinin azaldığı tespit

edilmiştir. 588 çeşit cDNA içeren arraylerin kullanıldığı bu çalışmadan elde edilen sonuçlar kantitatif PCR ile valide edilmiştir. Validasyon çalışması sonucunda da 24 genin ifade artışı, 8 genin ifade düşüşü doğrulanmıştır. İfadesi artan genler içerisinde hücre döngüsü regülatör proteinleri, CDK10, p120, p21CIP1, p16INK4A; normal B hücre gelişiminde görev alan transkripsiyon faktörleri Pax-5, Id-2, hücre-hücre etkileşiminde görev alan genler, tümör nekroz faktörü (TNF), interlökin 2R γ ve IL-4R α genleri mevcutken, mikroçevre ya da hücre-hücre etkileşimleriyle ilişkili MRP14, MRP8, CD40, TMSB10 genlerinin ifadesinin düştüğü saptanmıştır (261).

Bu tez çalışmasında folliküler lenfoma vakalarında CDKN2B (p15) geninin ifade değişimi incelenmiştir. 21 vakanın 17'sinde ifade artış gözlenirken, geri kalan 3 vakada bu gen için ifade düşüşü saptanmıştır. CDKN2B ifade değişikliği paterni beklendiği üzere Smad2, Smad3, Smad4, Smad7 ve TGF β R1 ile de büyük ölçüde örtüşmektedir.

Epitel hücrelerinde TGF β , CDK4 ya da CDK6'nın siklin D ile kompleks oluşturmasını engelleyen CDK inhibitörü p15^{INK4b} ifadesini teşvik ettiği gösterilmiştir. TGF β antiproliferatif etkisini, hücre siklusunu G1 evresinde durdurularak gerçekleştirir. Bunun için de Smad3-Smad4 kompleksi FoxO transkripsiyon faktörleri ile, p15^{INK4b}'yi kodlayan CDKN2B ve p21CIP1'yi kodlayan CDKN1A genlerinin promotörlerini hedeflemek için birlikte hareket etmektedir. Bu yüzden bu genlerin ifade paternlerinin benzer olması beklenen bir durumdur (216).

Bu tez çalışmasında TGF β /Smad yolağının elemanlarından olan SARA (Smad Anchor for Receptor Activation. ZFYVE9)'nın da folliküler lenfoma hastalarındaki ifade düzeyindeki değişiklik araştırılmıştır. 21 vakanın 12'sinde ifade artışı gözlenirken, geriye kalan 9 vakada ifade düşüşü saptanmıştır.

SARA'nın mikroçevre ile ilişkisi hakkında literatürde çok az veri bulunmaktadır. SARA ifadesi ile ilgili monositlerde ve makrofajlarda yapılmış hiç çalışma bulunmamaktadır (263).

SARA ya da ZFYVE9'un aktiveleştirilmemiş Smad proteinleri ve TGF β reseptörleri ile direkt etkileşim ile TGF β sinyalinde rol aldığı düşünülmektedir. Ancak bu bilgiler tartışmaya açıktır, bir çalışmada farklı B hücreli lenfoma tiplerinde SARA ifadesi ile TGF aracılı Smad fosforilasyonu seviyesinde, Smad nükleer yerleşiminde ya da TGF β hedef genlerinin

uyarılmasında korelasyon olmadığı gösterilmiştir. R-Smadlar ve TGF β reseptörünün SARA ile etkileşimi immünopresipitasyon ile araştırılmış ancak herhangi bir ilişki tespit edilememiştir. Böylece SARA'nın fonksiyonel TGF β sinyali için mecburi bir rol almadığı anlaşılmıştır (264).

TGFB/Smad yolağındaki genlerin ifade değişikliği birçok hematolojik malignite tipinde araştırılmıştır (Çizelge 6.1.). Literatürde, 19 Pediatrik T hücreli akut lenfositik lösemi (ALL) vakasında western blot ve sekanslama yöntemleri kullanılarak Smad3 protein ifadesinde düşüş saptanmıştır (265). Northern blot yönteminin kullanıldığı bir başka çalışmada ise 13 kronik lenfositik lösemi (KLL) vakasında TGFBR1 geninde mutasyon sonucu ifade düşüşü saptanmıştır (266). 34 KLL vakasının incelendiği bir başka çalışmada ise microarray yöntemi ile TGFBRIII ifadesinde düşüş olduğu tespit edilmiştir (267). Jelinek ve arkadaşlarının B-KLL vakalarında yapmış olduğu bir diğer çalışmada ise microarray, RT-PCR ve Western blot metotları ile TGFBRIII geninin ifadesinde düşüş saptanmıştır (268).

18 kronik miyeloid lösemi (KML) hastasıyla yapılan bir çalışmada ise TGFBRII geninin ifadesinde düşüş olduğu tespit edilmiştir (269). Esansiyel trombositoz (ET) vakalarında yapılan bir başka çalışmada da Smad4 geninin ifadesinde düşüş saptanırken (270), ALL vakalarında Smad3 ve Smad7 ifadesinde artış saptanmıştır (271).

Çizelge 6.1. Literatürdeki Hematolojik Malignitelere TGFB/Smad Yolağındaki İfade Değişiklikleri (272).

BULGU	HASTALIK	REFERANS
Smad3 protein ifadesinde düşüş	Pediyatrik T-hücreli ALL	Wolfrain et al.(265)
TGFBR1 ifadesinde düşüş (mutasyon)	KLL	DeCoteau et al. (266)
TGFBRIII ifadesinde artış	KLL	Klein et al (267), Jelinek et al (268).
TGFBRII ifadesinde düşüş	KML	Rooke et al (269).
Smad4 ifadesinde düşüş	ET	Kuroda et al (270).
TGFBR1 ve TGFBRII ifadesinde düşüş	NHL	Capocasale et al (273)., Schiemann et al (274).
Smad3 ve Smad7 ifadesinde artış	ALL	Zhang et al (271).
TGFBR1 ifadesinde artış	NHL	Sebestyen et al (275).
Smad1 ifadesinde artış	FL	Husson et al (276).

Bizim çalışmamızda ise hücre döngüsünün regülasyonunda görev alan p15 (CDKN2B) geninin ifadesi FL örneklerinde, kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir. Bu tez çalışması kapsamında incelenen 7 genin (TGFβR1, Smad2, Smad3, Smad4, Smad6, Smad7, SARA, CDKN2B) hepsinin ifadelerinin genel olarak kontrol örneklerinden önemli ölçüde yüksek olduğu tespit edilmesine rağmen, örnek sayısının yetersizliği nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilememiştir.

Burada FOXP3 geninin TGFβ/Smad yolağındaki transkripsiyon faktörlerinin hedefi olduğu düşünüldüğünde FOXP3 ifadesi ile TGFβ/Smad yolağındaki genlerin ifadeleri arasında pozitif bir korelasyon olması beklenmektedir. Ancak bu tez çalışmasına konu olan TGFβ/Smad yolağındaki genlerin ifadelerinin değişiklikleri ile FOXP3, CD163 skorları arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır (p=0,913-1). FLIPI skorları ile TGFβ/Smad

yolağındaki TGFβR1, Smad2, Smad3, Smad4, Smad6, Smad7, SARA, CDKN2B genlerinin ifadeleri arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır ($p \geq 0,292-1$). Ayrıca kemik iliğı tutulumu ve Kİ67 ifadesi ile TGFβ/Smad yolağındaki TGFβR1, Smad2, Smad3, Smad4, Smad6, Smad7, SARA, CDKN2B genlerinin ifadeleri arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır ($p=0,717-0.972$).

Bu tez çalışmasında FL hastalarında, kontrol grubuna göre TGFβ/Smad yolağındaki genlerin ifadelerinde anlamlı bir artış gözlenmiş ve bu artış FLIPI skorlarıyla da ilişkilendirilebilmiş olsaydı, FL tedavi seçeneklerine alternatif ve/veya destekleyici olarak TGFβ/Smad yolağını hedefleyen terapötik ajanların kullanılma olasılığından bahsedebilirdik. Özellikle kanserin ileri evrelerinde tümör gelişimine katkıda bulunması nedeniyle TGFβ/Smad yolağı hedefe yönelik tedaviler için önemli bir potansiyele sahiptir. TGFβ'nın hedeflenmesinde, antisense oligonükleotidler (ASO), anti-TGFβ kanser aşıları (Belagenpneumatucel-L gibi) ve monoklonal antikorlar (2G7, 1D11, Lerdelimumab, Metelimumab ve Fresolimumab) kullanılabilir (277).

6.2. SONUÇ

- 1- Düşük dereceli (Grade I ve II) FL'larda klinik prognostik parametreler (yaş, evre, hemoglobin düzeyi, lenf nodu sayısı, kemik iliği tutulum durumu) ile tümör mikroçevresi belirteçleri olan Treg ve tümör ilişkili makrofajların, kontrol grubu olan reaktif lenfoid hiperplaziler ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulundurmadığı anlaşılmıştır.
- 2- TGFβ/Smad yolağındaki genlerin ifadelerinin, Treg açısından zengin veya makrofajlardan zengin mikroçevre organizasyonunda farklı bir patern sergilemediği saptanmıştır. Ancak genel olarak FL hastalarında kontrol grubuna göre bu gen ifadelerinde artış gözlenmiştir. Bu tez çalışmasına dahil edilen FL hastalarının çoğunluğunun ileri evrede tanı almış olduğu göz önüne alındığında, TGFβ/Smad yolağının burada tümör oluşumunun baskılanmasında etkin bir rol sergileyemediğini düşündürmektedir. Bu durum, TGFβ/Smad yolağındaki genlerin ifadelerinin mRNA düzeyindeki değişikliklerinin, çeşitli epigenetik mekanizmalar ile proteine yansımamasından kaynaklanmış olabilir.
- 3- FL hastalarında FOXP3 ve CD163 skorlarının, bu tez kapsamında incelenen TGFβ/Smad yolağındaki TGFBR1, Smad2, Smad3, Smad4, Smad6, Smad7, SARA ve CDKN2B genlerinin ifadelerindeki değişimle bir korelasyon bulundurmadığı anlaşılmıştır.
- 4- Elde edilen veriler teker teker değerlendirildiğinde birbirleriyle tutarlı olmalarına rağmen, hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlara ulaşılamamış olmasının nedenlerinden biri hasta ve kontrol gruplarının sayılarından kaynaklanabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Montoto S, Davies AJ, Matthews J, Calaminici M, Norton AJ, Amess J, et al. Risk and clinical implications of transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 2007 Jun 10 [cited 2017 May 9];25(17):2426–33. Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2006.09.3260>
2. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* [Internet]. 2016 May 19 [cited 2019 Jan 27];127(20):2375–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26980727>
3. İLTER H, KESKİNKILIÇ B. TÜRKİYE Kanı İstatistikleri. 2018; Available from: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2015.pdf
4. Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* [Internet]. 1998 Jul [cited 2017 May 9];9(7):717–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9739436>
5. Horning SJ, Rosenberg SA. The Natural History of Initially Untreated Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphomas. *N Engl J Med* [Internet]. 1984 Dec 6 [cited 2017 May 9];311(23):1471–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6548796>
6. Sugimoto T, Watanabe T. Follicular Lymphoma: The Role of the Tumor Microenvironment in Prognosis. *J Clin Exp Hematop*. 2016;56(1):1–19.
7. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* [Internet]. 2000;100(1):57–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931>
8. Global Cancer Data 2018 [Internet]. 2018 [cited 2020 Mar 21]. Available from: <https://www.uicc.org/news/new-global-cancer-data-globocan-2018>
9. Cancer Statistics for the UK [Internet]. [cited 2020 Jan 10]. Available from:

<https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics-for-the-uk>

10. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394–424.
11. Türkiye kanser istatistikleri ankara, 2016. 2016;
12. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2017;67(1):7–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28055103>
13. Swerdlow S, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues Revised Edition. 2017.
14. Takata K, Miyata-Takata T, Sato Y, Yoshino T. Pathology of follicular lymphoma. *J Clin Exp Hematop* [Internet]. 2014;54(1):3–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24942942>
15. Zhang Y, Sanjose S De, Bracci PM, Morton LM, Wang R, Brennan P, et al. Personal use of hair dye and the risk of certain subtypes of non-Hodgkin lymphoma. *Am J Epidemiol*. 2008 Jun;167(11):1321–31.
16. Agopian J, Navarro JM, Gac AC, Lecluse Y, Briand M, Grenot P, et al. Agricultural pesticide exposure and the molecular connection to lymphomagenesis. *J Exp Med*. 2009 Jul 6;206(7):1473–83.
17. Talamini R, Polesel J, Montella M, Dal Maso L, Crispo A, Spina M, et al. Smoking and non-Hodgkin lymphoma: Case-control study in Italy. *Int J Cancer*. 2005 Jul 1;115(4):606–10.
18. Conconi A, Ponzio C, Lobetti-Bodoni C, Motta M, Rancoita PMV, Stathis A, et al. Incidence, risk factors and outcome of histological transformation in follicular lymphoma. *Br J Haematol*. 2012 Apr;157(2):188–96.
19. Herold M, Haas A, Srock S, Nesper S, Al-Ali KH, Neubauer A, et al. Rituximab Added

- to First-Line Mitoxantrone, Chlorambucil, and Prednisolone Chemotherapy Followed by Interferon Maintenance Prolongs Survival in Patients With Advanced Follicular Lymphoma: An East German Study Group Hematology and Oncology Study. *J Clin Oncol* [Internet]. 2007 May 20 [cited 2019 Jan 27];25(15):1986–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17420513>
20. Hiddemann W, Cheson BD. How we manage follicular lymphoma. *Leukemia* [Internet]. 2014;28(7):1388–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24577532>
 21. Leich E, Ott G, Rosenwald A. Pathology, pathogenesis and molecular genetics of follicular NHL. *Best Pract Res Clin Haematol* [Internet]. 2011 Jun [cited 2015 Mar 6];24(2):95–109. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21658611>
 22. Ott G, Katzenberger T, Lohr A, Kindelberger S, Rüdiger T, Wilhelm M, et al. Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. *Blood*. 2002 May 15;99(10):3806–12.
 23. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* [Internet]. 1999 Dec [cited 2019 Jan 27];10(12):1419–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10643532>
 24. Hans CP, Weisenburger DD, Vose JM, Hock LM, Lynch JC, Aoun P, et al. A significant diffuse component predicts for inferior survival in grade 3 follicular lymphoma, but cytologic subtypes do not predict survival. *Blood* [Internet]. 2003 Mar 15 [cited 2019 Jan 27];101(6):2363–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12424193>
 25. Xerri L, Dirnhofer S, Quintanilla-Martinez L, Sander B, Chan JKC, Campo E, et al. The heterogeneity of follicular lymphomas: from early development to transformation. Vol. 468, *Virchows Archiv*. Springer Verlag; 2016. p. 127–39.

26. Chau I, Jones R, Cunningham D, Wotherspoon A, Maisey N, Norman AR, et al. Outcome of follicular lymphoma grade 3: is anthracycline necessary as front-line therapy? *Br J Cancer* [Internet]. 2003 Jul 1 [cited 2019 Jan 27];89(1):36–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12838297>
27. Wang SA, Wang L, Hochberg EP, Muzikansky A, Harris NL, Hasserjian RP. Low histologic grade follicular lymphoma with high proliferation index: Morphologic and clinical features. *Am J Surg Pathol*. 2005 Nov;29(11):1490–6.
28. Koster A, Tromp HA, Raemaekers JMM, Borm GF, Hebeda K, MacKenzie MA, et al. The prognostic significance of the intra-follicular tumor cell proliferative rate in follicular lymphoma. *Haematologica*. 2007;92(2).
29. Huet S, Sujobert P, Salles G. From genetics to the clinic: a translational perspective on follicular lymphoma. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2018 Feb 9 [cited 2019 Jan 27];18(4):224–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29422597>
30. Zelenetz AD, Chu G, Galili N, Bangs CD, Horning SJ, Donlon TA, et al. Enhanced detection of the t(14;18) translocation in malignant lymphoma using pulsed-field gel electrophoresis. *Blood* [Internet]. 1991 Sep 15 [cited 2019 Jan 27];78(6):1552–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1884022>
31. Weiss LM, Warnke RA, Sklar J, Cleary ML. Molecular Analysis of the T(14;18) Chromosomal Translocation in Malignant Lymphomas. *N Engl J Med* [Internet]. 1987 Nov 5 [cited 2019 Jan 27];317(19):1185–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3657890>
32. Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* [Internet]. 1985 Sep 27 [cited 2017 May 9];229(4720):1390–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3929382>
33. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* [Internet]. 1985 Jun 21 [cited 2019 Jan 27];228(4706):1440–3. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3874430>

34. Cleary ML, Sklar J. Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1985 Nov [cited 2017 May 9];82(21):7439–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2865728>
35. Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, et al. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around Jh on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* [Internet]. 1985 Jul [cited 2015 Jul 2];41(3):899–906. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3924412>
36. Zinkel S, Gross A, Yang E. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ* [Internet]. 2006 Aug 9 [cited 2019 Jan 27];13(8):1351–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16763616>
37. Rickert RC. New insights into pre-BCR and BCR signalling with relevance to B cell malignancies. Vol. 13, *Nature Reviews Immunology*. *Nat Rev Immunol*; 2013. p. 578–91.
38. Limpens J, Stad R, Vos C, de Vlaam C, de Jong D, van Ommen GJ, et al. Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood* [Internet]. 1995 May 1 [cited 2019 Jan 27];85(9):2528–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7727781>
39. Dölken G, Illerhaus G, Hirt C, Mertelsmann R. BCL-2/JH rearrangements in circulating B cells of healthy blood donors and patients with nonmalignant diseases. *J Clin Oncol* [Internet]. 1996 Apr [cited 2019 Jan 27];14(4):1333–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8648392>
40. Bende RJ, Smit LA, van Noesel CJM. Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia* [Internet]. 2007 Jan 12 [cited 2019 Jan 27];21(1):18–29. Available from: <http://www.nature.com/articles/2404426>

41. Lenz G, Staudt LM. Aggressive Lymphomas. Schwartz RS, editor. *N Engl J Med* [Internet]. 2010 Apr 15 [cited 2019 Jan 27];362(15):1417–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20393178>
42. Pasqualucci L, Bhagat G, Jankovic M, Compagno M, Smith P, Muramatsu M, et al. AID is required for germinal center–derived lymphomagenesis. *Nat Genet* [Internet]. 2008 Jan 9 [cited 2019 Jan 27];40(1):108–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18066064>
43. Horsman DE, Connors JM, Pantzar T, Gascoyne RD. Analysis of secondary chromosomal alterations in 165 cases of follicular lymphoma with t(14;18). *Genes Chromosomes Cancer* [Internet]. 2001 Apr [cited 2019 Jan 27];30(4):375–82. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/gcc.1103>
44. Johansson B, Mertens F, Mitelman F. Cytogenetic evolution patterns in non-Hodgkin’s lymphoma. *Blood* [Internet]. 1995 Nov 15 [cited 2017 May 9];86(10):3905–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7579360>
45. Viardot A, Möller P, Högel J, Werner K, Mechttersheimer G, Ho AD, et al. Clinicopathologic correlations of genomic gains and losses in follicular lymphoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 2002 Dec 1 [cited 2019 Jan 27];20(23):4523–30. Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2002.12.006>
46. Cheung K-JJ, Shah SP, Steidl C, Johnson N, Relander T, Telenius A, et al. Genome-wide profiling of follicular lymphoma by array comparative genomic hybridization reveals prognostically significant DNA copy number imbalances. *Blood* [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2019 Jan 27];113(1):137–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18703704>
47. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RD, et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* [Internet]. 2011 Aug 18 [cited 2015 Jun 10];476(7360):298–303. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10351>
48. Guo C, Chang C-C, Wortham M, Chen LH, Kernagis DN, Qin X, et al. Global

- identification of MLL2-targeted loci reveals MLL2's role in diverse signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2012 Oct 23 [cited 2015 Jul 2];109(43):17603–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3491484&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
49. Ochando J, Braza MS. T follicular helper cells: a potential therapeutic target in follicular lymphoma. 2017; Available from: www.impactjournals.com/oncotarget
50. Yap DB, Chu J, Berg T, Schapira M, Cheng S-WG, Moradian A, et al. Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. *Blood* [Internet]. 2011 Feb 24 [cited 2015 Jun 26];117(8):2451–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3062411&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
51. Ryan RJH, Nitta M, Borger D, Zukerberg LR, Ferry JA, Harris NL, et al. EZH2 Codon 641 Mutations are Common in BCL2-Rearranged Germinal Center B Cell Lymphomas. Zhang L, editor. *PLoS One* [Internet]. 2011 Dec 14 [cited 2015 Jul 2];6(12):e28585. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3237460&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
52. Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, et al. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* [Internet]. 2006 Feb 16 [cited 2015 Jun 11];439(7078):871–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature04431>
53. McCabe MT, Ott HM, Ganji G, Korenchuk S, Thompson C, Van Aller GS, et al. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature* [Internet]. 2012 Dec 6 [cited 2014 Jul 11];492(7427):108–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23051747>
54. Pasqualucci L, Dominguez-Sola D, Chiarenza A, Fabbri G, Grunn A, Trifonov V, et al. Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature*

- [Internet]. 2011 Mar 10 [cited 2015 Jun 18];471(7337):189–95. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3271441&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
55. Lohr JG, Stojanov P, Lawrence MS, Auclair D, Chapuy B, Sougnez C, et al. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2012 Mar 6 [cited 2015 Jul 6];109(10):3879–84. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3309757&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
56. Blombery P a, Dickinson M, Westerman D a. Molecular lesions in B-cell lymphoproliferative disorders: recent contributions from studies utilizing high-throughput sequencing techniques. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2014 Jan [cited 2015 Mar 6];55(1):19–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23550993>
57. Kishimoto W, Nishikori M. Molecular pathogenesis of follicular lymphoma. *J Clin Exp Hematop*. 2014;54(1):23–30.
58. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2008 Jan 1 [cited 2019 Jan 29];8(1):22–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18097447>
59. Young RM, Staudt LM. Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2013 Mar 1 [cited 2019 Jan 29];12(3):229–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23449308>
60. Bouska A, McKeithan TW, Deffenbacher KE, Lachel C, Wright GW, Iqbal J, et al. Genome-wide copy-number analyses reveal genomic abnormalities involved in transformation of follicular lymphoma. *Blood* [Internet]. 2014 Mar 13 [cited 2019 Jan 27];123(11):1681–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24037725>
61. Kridel R, Mottok A, Farinha P, Ben-Neriah S, Ennishi D, Zheng Y, et al. Cell-of-

- origin of transformed follicular lymphoma. *Blood* [Internet]. 2015;126(18):2118–27. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/126/18/2118.abstract>
62. Slot LM, Hoogeboom R, Smit LA, Wormhoudt TAM, Biemond BJ, Oud MECM, et al. B-Lymphoblastic Lymphomas Evolving from Follicular Lymphomas Co-Express Surrogate Light Chains and Mutated Gamma Heavy Chains. *Am J Pathol* [Internet]. 2016 Dec [cited 2019 Jan 27];186(12):3273–84. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000294401630373X>
 63. Elenitoba-Johnson KS, Gascoyne RD, Lim MS, Chhanabai M, Jaffe ES, Raffeld M. Homozygous deletions at chromosome 9p21 involving p16 and p15 are associated with histologic progression in follicle center lymphoma. *Blood* [Internet]. 1998 Jun 15 [cited 2019 Jan 27];91(12):4677–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9616165>
 64. Lossos IS, Alizadeh AA, Diehn M, Warnke R, Thorstenson Y, Oefner PJ, et al. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large-cell lymphoma: Alternative patterns with increased or decreased expression of c-myc and its regulated genes. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2002 Jun 25 [cited 2019 Jan 27];99(13):8886–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12077300>
 65. Yano T, Jaffe ES, Longo DL, Raffeld M. MYC rearrangements in histologically progressed follicular lymphomas. *Blood* [Internet]. 1992 Aug 1 [cited 2019 Jan 27];80(3):758–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1638027>
 66. Okosun J, Bödör C, Wang J, Araf S, Yang C-Y, Pan C, et al. Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. *Nat Genet*. 2014 Feb 22;46(2):176–81.
 67. Pasqualucci L, Khiabani H, Fangazio M, Vasishtha M, Messina M, Holmes ABB, et al. Genetics of Follicular Lymphoma Transformation. *Cell Rep* [Internet]. 2014 Jan 16 [cited 2019 Jan 27];6(1):130–40. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124713007857>
 68. Kridel R, Chan FC, Mottok A, Boyle M, Farinha P, Tan K, et al. Histological

- Transformation and Progression in Follicular Lymphoma: A Clonal Evolution Study. *PLoS Med.* 2016;13(12):1–25.
69. Tomita S, Kojima M, Imura J, Hori H, Ueda Y, Koitabashi A, et al. Extranodal diffuse follicular center lymphoma mimicking mantle cell lymphoma of the intestine. *Am J Hematol* [Internet]. 2003 Dec [cited 2019 Jan 29];74(4):287–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14635213>
 70. Goodlad JR, MacPherson S, Jackson R, Batstone P, White J, Scotland and Newcastle Lymphoma Group. Extranodal follicular lymphoma: a clinicopathological and genetic analysis of 15 cases arising at non-cutaneous extranodal sites. *Histopathology* [Internet]. 2004 Mar [cited 2019 Jan 29];44(3):268–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14987231>
 71. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, et al. Recommendations for Initial Evaluation, Staging, and Response Assessment of Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma: The Lugano Classification. *J Clin Oncol* [Internet]. 2014 Sep 20 [cited 2019 Jan 29];32(27):3059–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25113753>
 72. Dada R. Diagnosis and management of follicular lymphoma: A comprehensive review. *Eur J Haematol* [Internet]. 2019 Jun 10 [cited 2019 Jul 26]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31270855>
 73. Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P, White J, Armitage JO, Arranz-Saez R, et al. Follicular Lymphoma International Prognostic Index. *Blood* [Internet]. 2004 Sep 1 [cited 2017 May 9];104(5):1258–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15126323>
 74. Luminari S, Bellei M, Biasoli I, Federico M. Follicular lymphoma. *Rev Bras Hematol Hemoter* [Internet]. 2011;34(1):54–9. Available from: <http://www.rbhh.org/?doi=10.5581/1516-8484.20120015>
 75. Federico M, Bellei M, Marcheselli L, Luminari S, Lopez-Guillermo A, Vitolo U, et al. Follicular Lymphoma International Prognostic Index 2: A New Prognostic Index

- for Follicular Lymphoma Developed by the International Follicular Lymphoma Prognostic Factor Project. *J Clin Oncol* [Internet]. 2009 Sep 20 [cited 2019 Jan 30];27(27):4555–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19652063>
76. Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, Schmitz N, Lengfelder E, Schmits R, et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood* [Internet]. 2005 Dec 1 [cited 2019 Jan 27];106(12):3725–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16123223>
77. Bargetzi M, Baumann R, Cogliatti S, Dietrich PY, Duchosal M, Goede J, et al. Diagnosis and treatment of follicular lymphoma: an update. Vol. 148, *Swiss medical weekly*. NLM (Medline); 2018. p. w14635.
78. Seymour JF, Pro B, Fuller LM, Manning JT, Hagemester FB, Romaguera J, et al. Long-term follow-up of a prospective study of combined modality therapy for stage I-II indolent non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2003 Jun 1;21(11):2115–22.
79. Hoskin PJ, Kirkwood AA, Popova B, Smith P, Robinson M, Gallop-Evans E, et al. 4 Gy versus 24 Gy radiotherapy for patients with indolent lymphoma (FORT): A randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(4):457–63.
80. Guadagnolo BA, Li S, Neuberg D, Ng A, Hua L, Silver B, et al. Long-term outcome and mortality trends in early-stage, Grade 1-2 follicular lymphoma treated with radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006 Mar 1;64(3):928–34.
81. Brady JL, Binkley MS, Hajj C, Chelius M, Chau K, Balogh A, et al. Definitive radiotherapy for localized follicular lymphoma staged by 18F-FDG PET-CT: A collaborative study by ILROG. *Blood*. 2019 Jan 17;133(3):237–45.
82. Advani R, Rosenberg SA, Horning SJ. Stage I and II follicular non-Hodgkin's

- lymphoma: Long-term follow-up of no initial therapy. *J Clin Oncol*. 2004;22(8):1454–9.
83. Ardeshtna KM, Smith P, Norton A, Hancock BW, Hoskin PJ, MacLennan KA, et al. Long-term effect of a watch and wait policy versus immediate systemic treatment for asymptomatic advanced-stage non-Hodgkin lymphoma: A randomised controlled trial. *Lancet*. 2003 Aug 16;362(9383):516–22.
84. Brice P, Bastion Y, Lepage E, Brousse N, Haioun C, Moreau P, et al. Comparison in low-tumor-burden follicular lymphomas between an initial no-treatment policy, prednimustine, or interferon alfa: A randomized study from the Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires. *J Clin Oncol*. 1997;15(3):1110–7.
85. Fisher RI, LeBlanc M, Press OW, Maloney DG, Unger JM, Miller TP. New Treatment Options Have Changed the Survival of Patients With Follicular Lymphoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 2005 Nov 20 [cited 2019 Jan 27];23(33):8447–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16230674>
86. Stevens WBCC, Mendeville M, Redd R, Clear AJ, Bladergroen R, Calaminici M, et al. Prognostic relevance of CD163 and CD8 combined with EZH2 and gain of chromosome 18 in follicular lymphoma: A study by the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *Haematologica* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2018 Aug 5];102(8):1413–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28411252>
87. Marcus R, Davies A, Ando K, Klapper W, Opat S, Owen C, et al. Obinutuzumab for the first-line treatment of follicular lymphoma. *N Engl J Med*. 2017 Oct 5;377(14):1331–44.
88. Salles GA, Morschhauser F, Solal-Céligny P, Thieblemont C, Lamy T, Tilly H, et al. Obinutuzumab (GA101) in patients with relapsed/Refractory indolent non-hodgkin lymphoma: Results from the phase II GAUGUIN study. *J Clin Oncol*. 2013 Aug 10;31(23):2920–6.
89. Radford J, Davies A, Cartron G, Morschhauser F, Salles G, Marcus R, et al. Obinutuzumab (GA101) plus CHOP or FC in relapsed/refractory follicular

- lymphoma: Results of the GAUDI study (BO21000). *Blood*. 2013 Aug 15;122(7):1137–43.
90. Van Oers MHJ, Klasa R, Marcus RE, Wolf M, Kimby E, Gascoyne RD, et al. Rituximab maintenance improves clinical outcome of relapsed/resistant follicular non-Hodgkin lymphoma in patients both with and without rituximab during induction: Results of a prospective randomized phase 3 intergroup trial. *Blood*. 2006 Nov 15;108(10):3295–301.
 91. Leonard JP, Jung SH, Johnson J, Pitcher BN, Bartlett NL, Blum KA, et al. Randomized trial of lenalidomide alone versus lenalidomide plus rituximab in patients with recurrent follicular lymphoma: CALGB 50401 (Alliance). *J Clin Oncol*. 2015 Nov 1;33(31):3635–40.
 92. Cheson BD. Radioimmunotherapy of non-Hodgkin lymphomas. Vol. 101, *Blood*. American Society of Hematology; 2003. p. 391–8.
 93. Russo AL, Chen YH, Martin NE, Vinjamoori A, Luthy SK, Freedman A, et al. Low-dose involved-field radiation in the treatment of non-Hodgkin lymphoma: Predictors of response and treatment failure. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2013 May 1;86(1):121–7.
 94. Montoto S, Corradini P, Dreyling M, Ghilmini M, Kimby E, López-Guillermo A, et al. Indications for hematopoietic stem cell transplantation in patients with follicular lymphoma: A consensus project of the EBMT-lymphoma working party. *Haematologica*. 2013 Jul;98(7):1014–21.
 95. Bierman PJ, Vose JM, Anderson JR, Bishop MR, Kessinger A, Armitage JO. High-dose therapy with autologous hematopoietic rescue for follicular low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 1997;15(2):445–50.
 96. Y B, P B, C H, A S, G S, JP M, et al. Intensive Therapy With Peripheral Blood Progenitor Cell Transplantation in 60 Patients With Poor-Prognosis Follicular Lymphoma. *Blood*. 1995;86(8).
 97. Yang Z-Z, Novak AJ, Ziesmer SC, Witzig TE, Ansell SM. Malignant B Cells Skew

- the Balance of Regulatory T Cells and T_H 17 Cells in B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *Cancer Res* [Internet]. 2009 Jul 1 [cited 2019 Jan 27];69(13):5522–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19509224>
98. Guilloton F, Caron G, Menard C, Pangault C, Ame-Thomas P, Dulong J, et al. Mesenchymal stromal cells orchestrate follicular lymphoma cell niche through the CCL2-dependent recruitment and polarization of monocytes. *Blood* [Internet]. 2012 Mar 15 [cited 2019 Jan 27];119(11):2556–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22289889>
99. Kridel R, Sehn LH, Gascoyne RD. Review series Pathogenesis of follicular lymphoma. *J Clin Invest* [Internet]. 2012 Oct 1 [cited 2019 Jan 27];122(10):3424–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23023713>
100. Dave SS, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Gascoyne RD, Chan WC, et al. Prediction of Survival in Follicular Lymphoma Based on Molecular Features of Tumor-Infiltrating Immune Cells. *N Engl J Med* [Internet]. 2004 Nov 18 [cited 2017 May 9];351(21):2159–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15548776>
101. Shain KH, Dalton WS, Tao J. The tumor microenvironment shapes hallmarks of mature B-cell malignancies. 2015;(August 2014):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2014.403>
102. Coelho V, Krysov S, Ghaemmaghami AM, Emara M, Potter KN, Johnson P, et al. Glycosylation of surface Ig creates a functional bridge between human follicular lymphoma and microenvironmental lectins. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2010 Oct 26 [cited 2019 Jan 28];107(43):18587–92. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1009388107>
103. Linley A, Krysov S, Ponzoni M, Johnson PW, Packham G, Stevenson FK. Lectin binding to surface Ig variable regions provides a universal persistent activating signal for follicular lymphoma cells. *Blood* [Internet]. 2015 Oct 15 [cited 2019 Jan 28];126(16):1902–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26194765>

104. Kiaii S, Clear AJ, Ramsay AG, Davies D, Sangaralingam A, Lee A, et al. Follicular lymphoma cells induce changes in T-cell gene expression and function: potential impact on survival and risk of transformation. *J Clin Oncol* [Internet]. 2013 Jul 20 [cited 2017 May 9];31(21):2654–61. Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2012.44.2137>
105. de Jong D. Molecular Pathogenesis of Follicular Lymphoma: A Cross Talk of Genetic and Immunologic Factors. *J Clin Oncol* [Internet]. 2005 Sep 10 [cited 2019 Jan 29];23(26):6358–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16155020>
106. Monti S, Savage KJ, Kutok JL, Feuerhake F, Kurtin P, Mihm M, et al. Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood* [Internet]. 2005 Mar 1 [cited 2019 Jan 29];105(5):1851–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15550490>
107. Scott DW, Gascoyne RD. The tumour microenvironment. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2014;14(8):517–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3774>
108. Wrzesinski SH, Wan YY, Flavell RA. Transforming growth factor- β and the immune response: Implications for anticancer therapy. Vol. 13, *Clinical Cancer Research*. Clin Cancer Res; 2007. p. 5262–70.
109. Akhurst RJ, Hata A. Targeting the TGF β signalling pathway in disease. Vol. 11, *Nature Reviews Drug Discovery*. Nat Rev Drug Discov; 2012. p. 790–811.
110. Yamaguchi Y, Tsumura H, Miwa M, Inaba K. Contrasting effects of TGF- β 1 and TNF- α on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow. *Stem Cells*. 1997;15(2):144–53.
111. Ramesh S, Wildey GM, Howe PH. Transforming growth factor β (TGF β)-induced apoptosis: The rise & fall of Bim. Vol. 8, *Cell Cycle*. Taylor and Francis Inc.; 2009. p. 11–7.
112. Ahmadzadeh M, Rosenberg SA. TGF- β 1 Attenuates the Acquisition and Expression

- of Effector Function by Tumor Antigen-Specific Human Memory CD8 T Cells. *J Immunol*. 2005 May 1;174(9):5215–23.
113. Thomas DA, Massagué J. TGF- β directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*. 2005 Nov;8(5):369–80.
 114. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson A-KL, Flavell RA. Transforming Growth Factor- β Regulation of Immune Responses. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2006;24(1):99–146. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090737>
 115. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. Vol. 23, *Trends in Immunology*. Trends Immunol; 2002. p. 549–55.
 116. McDonald PP, Fadok VA, Bratton D, Henson PM. Transcriptional and Translational Regulation of Inflammatory Mediator Production by Endogenous TGF- β in Macrophages That Have Ingested Apoptotic Cells. *J Immunol*. 1999;163(11).
 117. Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: Development and Tissue Specialization. *Annu Rev Immunol*. 2015 Mar 21;33(1):643–75.
 118. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2017.
 119. Chen ML, Pittet MJ, Gorelik L, Flavell RA, Weissleder R, Von Boehmer H, et al. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF- β signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jan 11;102(2):419–24.
 120. Ranges GE, Figari IS, Espevik T, Palladino MA. Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor β and reversal by recombinant tumor necrosis factor α . *J Exp Med*. 1987 Oct 1;166(4):991–8.
 121. Moo-Young TA, Larson JW, Belt BA, Tan MC, Hawkins WG, Eberlein TJ, et al. Tumor-derived TGF- β mediates conversion of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in a

- murine model of pancreas cancer. *J Immunother*. 2009 Jan;32(1):12–21.
122. Tsushima H, Kawata S, Tamura S, Ito N, Shirai Y, Kiso S, et al. High levels of transforming growth factor in patients with colorectal cancer: Association with disease progression. *Gastroenterology*. 1996;110(2):375–82.
 123. Walker RA, Dearing SJ. Transforming growth factor beta1 in ductal carcinoma in situ and invasive carcinomas of the breast. In: *European Journal of Cancer*. *Eur J Cancer*; 1992. p. 641–4.
 124. Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* [Internet]. 2001 Sep [cited 2019 Jan 29];2(9):816–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11526392>
 125. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, et al. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* [Internet]. 2001 Aug [cited 2019 Jan 29];182:18–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11722621>
 126. Piccirillo C, Shevach EM. Naturally-occurring CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance. *Semin Immunol* [Internet]. 2004 Apr [cited 2019 Jan 29];16(2):81–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15036231>
 127. Serag El-Dien MM, Abdou AG, Asaad NY, Abd El-Wahed MM, Kora MAE-HM. Intratumoral FOXP3+ Regulatory T Cells in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* [Internet]. 2017 Sep [cited 2019 Jan 29];25(8):534–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26862953>
 128. Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2002 Jun 1 [cited 2019 Jan 29];2(6):389–400. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri821>
 129. Hadaschik EN, Enk AH. TGF- β 1-induced regulatory T cells. *Hum Immunol*

- [Internet]. 2015 Aug [cited 2019 Jan 29];76(8):561–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26116540>
130. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* [Internet]. 1998 Jul 20 [cited 2019 Jan 29];188(2):287–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9670041>
 131. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* [Internet]. 2003 Apr 3 [cited 2019 Jan 29];4(4):330–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12612578>
 132. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K, Li L, Marinos N, et al. Conversion of Peripheral CD4⁺CD25⁻ Naive T Cells to CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor *Foxp3*. *J Exp Med* [Internet]. 2003 Dec 15 [cited 2019 Jan 29];198(12):1875–86. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20030152>
 133. Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, Tykocinski ML, Greene MI, Tone M. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat Immunol* [Internet]. 2008 Feb 23 [cited 2019 Jan 29];9(2):194–202. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18157133>
 134. Levings MK, Sangregorio R, Sartirana C, Moschin AL, Battaglia M, Orban PC, et al. Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med* [Internet]. 2002 Nov 18 [cited 2019 Jan 29];196(10):1335–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438424>
 135. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Manetti R, Vanini V, et al. Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. *J Exp Med* [Internet]. 2002 Aug 5 [cited 2019 Jan 29];196(3):379–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163566>

136. Yang Z, Novak AJ, Stenson MJ, Witzig TE, Ansell SM. Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell – mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* [Internet]. 2006;107(9):3639–46. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2781854&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
137. Qin S, Cobbold SP, Pope H, Elliott J, Kioussis D, Davies J, et al. “Infectious” transplantation tolerance. *Science* [Internet]. 1993 Feb 12 [cited 2019 Jan 29];259(5097):974–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8094901>
138. Mittal S, Marshall NA, Duncan L, Culligan DJ, Barker RN, Vickers MA. Local and systemic induction of CD4+CD25+ regulatory T-cell population by non-Hodgkin lymphoma. *Blood* [Internet]. 2008 Jun 1 [cited 2019 Jan 29];111(11):5359–70. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2007-08-105395>
139. Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, Went P, Pileri SA, Dirnhofer S. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin’s lymphoma. *Haematologica* [Internet]. 2008 Feb 1 [cited 2019 Jan 30];93(2):193–200. Available from: <http://www.haematologica.org/cgi/doi/10.3324/haematol.11702>
140. Ahearne MJ, Bhuller K, Hew R, Ibrahim H, Naresh K, Wagner SD. Expression of PD-1 (CD279) and FoxP3 in diffuse large B-cell lymphoma. 2014 Sep 11 [cited 2019 Jan 30];465(3). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00428-014-1615-5>
141. Piconese S, Pittoni P, Burocchi A, Gorzanelli A, Carè A, Tripodo C, et al. A non-redundant role for OX40 in the competitive fitness of Treg in response to IL-2. *Eur J Immunol* [Internet]. 2010 Oct [cited 2019 Jan 30];40(10):2902–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20806292>
142. Tripodo C, Gri G, Piccaluga PP, Frossi B, Guarnotta C, Piconese S, et al. Mast cells and Th17 cells contribute to the lymphoma-associated pro-inflammatory

- microenvironment of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Pathol* [Internet]. 2010 Aug [cited 2019 Jan 30];177(2):792–802. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010601356>
143. Wang J, Ke X-Y. The Four types of Tregs in malignant lymphomas. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2011 Dec 9 [cited 2019 Jan 30];4(1):50. Available from: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-8722-4-50>
144. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* [Internet]. 2013 Apr 25 [cited 2019 Jan 30];496(7446):445–55. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature12034>
145. Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today* [Internet]. 1992 Jan [cited 2019 Jan 30];13(7):265–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1388654>
146. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* [Internet]. 2010 Oct 20 [cited 2019 Jan 30];11(10):889–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20856220>
147. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science* (80-) [Internet]. 2010 Feb 5 [cited 2019 Jan 30];327(5966):656–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20133564>
148. Ginhoux F, Schultze JL, Murray PJ, Ochando J, Biswas SK. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nat Immunol* [Internet]. 2016 Jan [cited 2019 Jan 30];17(1):34–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26681460>
149. Hambardzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat Neurosci* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2019 Jan 30];19(1):20–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26713745>
150. De Palma M, Lewis CE. Macrophage Regulation of Tumor Responses to Anticancer

- Therapies. *Cancer Cell* [Internet]. 2013 Mar 18 [cited 2019 Jan 30];23(3):277–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23518347>
151. Farinha P, Masoudi H, Skinnider BF, Shumansky K, Spinelli JJ, Gill K, et al. Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma (FL). *Blood* [Internet]. 2005 Sep 15 [cited 2017 May 9];106(6):2169–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15933054>
 152. Alvaro T, Lejeune M, Camacho FI, Salvadó MT, Sánchez L, García JF, et al. The presence of STAT1-positive tumor-associated macrophages and their relation to outcome in patients with follicular lymphoma. *Haematologica* [Internet]. 2006 Dec [cited 2019 Jan 30];91(12):1605–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17145596>
 153. Adams DO, Hamilton TA. The Cell Biology of Macrophage Activation. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 1984 Apr [cited 2019 Jan 30];2(1):283–318. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6100475>
 154. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2011 Apr 23 [cited 2019 Jan 30];29(1):235–71. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-031210-101324>
 155. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* [Internet]. 1996 Oct 15 [cited 2019 Jan 30];56(20):4625–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8840975>
 156. Noy R, Pollard JW. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity* [Internet]. 2014 Jul 17 [cited 2019 Jan 30];41(1):49–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25035953>
 157. Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature* [Internet]. 1988 Jul 21 [cited 2019 Jan

- 30];334(6179):260–2. Available from: <http://www.nature.com/articles/334260a0>
158. Wahl SM. Transforming growth factor beta (TGF-beta) in inflammation: a cause and a cure. *J Clin Immunol* [Internet]. 1992 Mar [cited 2019 Jan 30];12(2):61–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1313827>
 159. Taskinen M, Karjalainen-Lindsberg M-LM-L, Nyman H, Eerola L-ML-M, Leppa S, Leppä S, et al. A High Tumor-Associated Macrophage Content Predicts Favorable Outcome in Follicular Lymphoma Patients Treated with Rituximab and Cyclophosphamide-Doxorubicin-Vincristine-Prednisone. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2007 Oct 1 [cited 2017 May 9];13(19):5784–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17908969>
 160. Kridel R, Xerri L, Gelas-Dore B, Tan K, Feugier P, Vawda A, et al. The prognostic impact of CD163-positive macrophages in follicular Lymphoma: A study from the BC cancer agency and the lymphoma study association. *Clin Cancer Res*. 2015;21(15):3428–35.
 161. Farinha P, Gascoyne RD. Molecular pathogenesis of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 2005 Sep 10 [cited 2015 Jul 9];23(26):6370–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16155022>
 162. Blaker YN, Spetalen S, Brodtkorb M, Lingjærde OC, Beiske K, Østenstad B, et al. The tumour microenvironment influences survival and time to transformation in follicular lymphoma in the rituximab era. *Br J Haematol*. 2016 Oct 1;175(1):102–14.
 163. Massagué J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2000 Dec 1 [cited 2019 Jan 28];1(3):169–78. Available from: <http://www.nature.com/articles/35043051>
 164. Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P. Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem* [Internet]. 2000 Dec [cited 2019 Jan 28];267(24):6954–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11106403>
 165. Massagué J. TGFβ signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2012 Oct

- 20 [cited 2018 Oct 25];13(10):616–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22992590>
166. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature* [Internet]. 2003 Oct 9 [cited 2019 Jan 28];425(6958):577–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14534577>
167. Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Cohen R, Cros J, Faivre S, Raymond E, et al. Targeting the TGF β pathway for cancer therapy. Vol. 147, *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier Inc.; 2015. p. 22–31.
168. Harrison CA, Al-Musawi SL, Walton KL. Prodomains regulate the synthesis, extracellular localisation and activity of TGF- β superfamily ligands. *Growth Factors* [Internet]. 2011 Oct 24 [cited 2019 Jan 28];29(5):174–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21864080>
169. Weiss A, Attisano L. The TGFbeta Superfamily Signaling Pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2018 Oct 25];2(1):47–63. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/wdev.86>
170. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* [Internet]. 1994 Aug 4 [cited 2019 Jan 28];370(6488):341–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8047140>
171. Feng X-H, Derynck R. SPECIFICITY AND VERSATILITY IN TGF- β SIGNALING THROUGH SMADS. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet]. 2005 Nov [cited 2019 Jan 28];21(1):659–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16212511>
172. Schmierer B, Hill CS. TGF β –SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2007 Dec 1 [cited 2019 Jan 28];8(12):970–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18000526>
173. Pardali E, Goumans M-J, ten Dijke P. Signaling by members of the TGF- β family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2010 Sep [cited 2019 Jan 28];20(9):556–67. Available from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0962892410001212>

174. Rebbapragada A, Benchabane H, Wrana JL, Celeste AJ, Attisano L. Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2003 Oct [cited 2019 Jan 28];23(20):7230–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14517293>
175. Feng X-H, Derynck R. A kinase subdomain of transforming growth factor- β (TGF- β) type I receptor determines the TGF- β intracellular signaling specificity. *EMBO J* [Internet]. 1997 Jul 1 [cited 2019 Jan 28];16(13):3912–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9233801>
176. Kanehisa Lab. TGF-beta signalling pathway [Internet]. 2019. Available from: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04350
177. Feng X-H, Derynck R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet]. 2005 Nov [cited 2019 Jan 28];21(1):659–93. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cellbio.21.022404.142018>
178. Patterson GI, Padgett RW. TGF beta-related pathways. Roles in *Caenorhabditis elegans* development. *Trends Genet* [Internet]. 2000 Jan [cited 2019 Jan 28];16(1):27–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10637628>
179. Huminiecki L, Goldovsky L, Freilich S, Moustakas A, Ouzounis C, Heldin C-H. Emergence, development and diversification of the TGF-beta signalling pathway within the animal kingdom. *BMC Evol Biol* [Internet]. 2009 Feb 3 [cited 2019 Jan 28];9(1):28. Available from: <http://bmcevolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2148-9-28>
180. Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* [Internet]. 2001 Dec [cited 2019 Jan 28];114(Pt 24):4359–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11792802>
181. Chen X, Xu L. Specific Nucleoporin Requirement for Smad Nuclear Translocation. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2010 Aug 15 [cited 2019 Jan 28];30(16):4022–34. Available

from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20547758>

182. Hill CS. Nucleocytoplasmic shuttling of Smad proteins. *Cell Res* [Internet]. 2009 Jan 30 [cited 2019 Jan 28];19(1):36–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19114992>
183. Dai F, Lin X, Chang C, Feng X-H. Nuclear Export of Smad2 and Smad3 by RanBP3 Facilitates Termination of TGF- β Signaling. *Dev Cell* [Internet]. 2009 Mar [cited 2019 Jan 28];16(3):345–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19289081>
184. Mullen ACC, Orlando DAA, Newman JJJ, Lovén J, Kumar RMM, Bilodeau S, et al. Master Transcription Factors Determine Cell-Type-Specific Responses to TGF- β Signaling. *Cell* [Internet]. 2011 Oct 28 [cited 2019 Jan 28];147(3):565–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22036565>
185. Trompouki E, Bowman T V., Lawton LN, Fan ZP, Wu D-CC, DiBiase A, et al. No Title. *Cell* [Internet]. 2011 Oct 28 [cited 2019 Jan 28];147(3). Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286741101155X>
186. Hata A, Seoane J, Lagna G, Montalvo E, Hemmati-Brivanlou A, Massagué J. OAZ uses distinct DNA- and protein-binding zinc fingers in separate BMP-Smad and Olf signaling pathways. *Cell* [Internet]. 2000 Jan 21 [cited 2019 Jan 28];100(2):229–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10660046>
187. Penheiter SG, Mitchell H, Garamszegi N, Edens M, Doré JJE, Leof EB. Internalization-dependent and -independent requirements for transforming growth factor beta receptor signaling via the Smad pathway. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2002 Jul [cited 2019 Jan 28];22(13):4750–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12052882>
188. Hayes S, Chawla A, Corvera S. TGF beta receptor internalization into EEA1-enriched early endosomes: role in signaling to Smad2. *J Cell Biol* [Internet]. 2002 Sep 30 [cited 2019 Jan 28];158(7):1239–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12356868>

189. Itoh S, Itoh F. Inhibitory machinery for the TGF- β family signaling pathway. *Growth Factors* [Internet]. 2011 Oct 13 [cited 2019 Jan 29];29(5):163–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21913798>
190. Di Guglielmo GM, Le Roy C, Goodfellow AF, Wrana JL. Distinct endocytic pathways regulate TGF- β receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2003 May 28 [cited 2019 Jan 29];5(5):410–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12717440>
191. Razani B, Zhang XL, Bitzer M, von Gersdorff G, Böttinger EP, Lisanti MP. Caveolin-1 Regulates Transforming Growth Factor (TGF)- β /SMAD Signaling through an Interaction with the TGF- β Type I Receptor. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 Mar 2 [cited 2019 Jan 29];276(9):6727–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11102446>
192. Inoue Y, Imamura T. Regulation of TGF- β family signaling by E3 ubiquitin ligases. *Cancer Sci* [Internet]. 2008 Nov [cited 2019 Jan 29];99(11):2107–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18808420>
193. Arora K, Warrior R. A new Smurf in the village. *Dev Cell* [Internet]. 2001 Oct [cited 2019 Jan 29];1(4):441–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11703932>
194. Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana JL, Thomsen GH. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* [Internet]. 1999 Aug 12 [cited 2019 Jan 29];400(6745):687–93. Available from: <http://www.nature.com/articles/23293>
195. Zhang Y, Chang C, Gehling DJ, Hemmati-Brivanlou A, Derynck R. Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2001 Jan 30 [cited 2019 Jan 29];98(3):974–9. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.98.3.974>
196. Wrighton KH, Feng X-H. To (TGF) β or not to (TGF) β : Fine-tuning of Smad signaling via post-translational modifications. *Cell Signal* [Internet]. 2008 Sep [cited 2019 Jan

- 29];20(9):1579–91. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0898656808000417>
197. Deheuninck J, Luo K. Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF-beta signaling. *Cell Res* [Internet]. 2009 Jan 30 [cited 2019 Jan 29];19(1):47–57. Available from: <http://www.nature.com/articles/cr2008324>
198. Xu J, Attisano L. Mutations in the tumor suppressors Smad2 and Smad4 inactivate transforming growth factor beta signaling by targeting Smads to the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2000 Apr 25 [cited 2019 Jan 29];97(9):4820–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10781087>
199. Grönroos E, Hellman U, Heldin C-H, Ericsson J. Control of Smad7 stability by competition between acetylation and ubiquitination. *Mol Cell* [Internet]. 2002 Sep [cited 2019 Jan 29];10(3):483–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12408818>
200. Lönn P, van der Heide LP, Dahl M, Hellman U, Heldin C-H, Moustakas A. PARP-1 Attenuates Smad-Mediated Transcription. *Mol Cell* [Internet]. 2010 Nov 24 [cited 2019 Jan 29];40(4):521–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21095583>
201. Shi Y, Wang YF, Jayaraman L, Yang H, Massagué J, Pavletich NP. Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* [Internet]. 1998 Sep 4 [cited 2019 Jan 29];94(5):585–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9741623>
202. Labbé E, Silvestri C, Hoodless PA, Wrana JL, Attisano L. Smad2 and Smad3 positively and negatively regulate TGF beta-dependent transcription through the forkhead DNA-binding protein FAST2. *Mol Cell* [Internet]. 1998 Jul [cited 2019 Jan 29];2(1):109–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9702197>
203. Zawel L, Dai JL, Buckhaults P, Zhou S, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell* [Internet].

- 1998 Mar [cited 2019 Jan 29];1(4):611–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9660945>
204. Chen X, Rubock MJ, Whitman M. A transcriptional partner for MAD proteins in TGF- β signalling. *Nature* [Internet]. 1996 Oct 24 [cited 2019 Jan 29];383(6602):691–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8878477>
205. Affolter M, Basler K. The Decapentaplegic morphogen gradient: from pattern formation to growth regulation. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2007 Sep 1 [cited 2019 Jan 29];8(9):663–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17703237>
206. Samad TA, Rebbapragada A, Bell E, Zhang Y, Sidis Y, Jeong S-J, et al. DRAGON, a Bone Morphogenetic Protein Co-receptor. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 Apr 8 [cited 2019 Jan 29];280(14):14122–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15671031>
207. Zhou Z, Xie J, Lee D, Liu Y, Jung J, Zhou L, et al. Neogenin Regulation of BMP-Induced Canonical Smad Signaling and Endochondral Bone Formation. *Dev Cell* [Internet]. 2010 Jul 20 [cited 2019 Jan 29];19(1):90–102. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20643353>
208. Massagué J, Niehrs C, Onichtchouk D, Chen Y-G, Dosch R, Gawantka V, et al. Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* [Internet]. 1999 Sep 30 [cited 2019 Jan 29];401(6752):480–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10519551>
209. Roberts AB, Wakefield LM. The two faces of transforming growth factor β in carcinogenesis. Vol. 100, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003. p. 8621–3.
210. Heldin CH, Landström M, Moustakas A. Mechanism of TGF- β signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. Vol. 21, *Current Opinion in Cell Biology*. 2009. p. 166–76.
211. Massagué J. TGF β in Cancer. Vol. 134, *Cell*. 2008. p. 215–30.

212. Wu MY, Hill CS. TGF- β Superfamily Signaling in Embryonic Development and Homeostasis. Vol. 16, Developmental Cell. 2009. p. 329–43.
213. Chen X, Weisberg E, Fridmacher V, Watanabe M, Naco G, Whitman M. Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. Nature [Internet]. 1997 Sep 4 [cited 2019 Jan 28];389(6646):85–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9288972>
214. Gomis RR, Alarcón C, He W, Wang Q, Seoane J, Lash A, et al. A FoxO-Smad synexpression group in human keratinocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Aug 22;103(34):12747–52.
215. Ma W, Zhang X, Wang X, Zhang Z, Yeh C-H, Uyeji J, et al. MPL mutation profile in JAK2 mutation-negative patients with myeloproliferative disorders. Diagn Mol Pathol [Internet]. 2011;20(1):34–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21326037>
216. Seoane J, Gomis RR. TGF- β Family Signaling in Tumor Suppression and Cancer Progression. Cold Spring Harb Perspect Biol [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2018 Oct 25];9(12):a022277. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28246180>
217. Kang Y, Chen CR, Massagué J. A self-enabling TGF β response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. Mol Cell. 2003 Apr 1;11(4):915–26.
218. Padua D, Zhang XHF, Wang Q, Nadal C, Gerald WL, Gomis RR, et al. TGF β Primes Breast Tumors for Lung Metastasis Seeding through Angiopoietin-like 4. Cell. 2008 Apr 4;133(1):66–77.
219. Petritsch C, Beug H, Baimain A, Oft M. TGF- β inhibits p70 S6 kinase via protein phosphatase 2A to induce G1 arrest. Genes Dev. 2000 Dec 15;14(24):3093–101.
220. Ramesh S, Qi XJ, Wildey GM, Robinson J, Molkenstin J, Letterio J, et al. TGF β -mediated BIM expression and apoptosis are regulated through SMAD3-dependent expression of the MAPK phosphatase MKP2. EMBO Rep. 2008;9(10):990–7.

221. Wang J, Yang L, Yang J, Kuropatwinski K, Wang W, Liu XQ, et al. Transforming growth factor β induces apoptosis through repressing the phosphoinositide 3-kinase/AKT/survivin pathway in colon cancer cells. *Cancer Res.* 2008 May 1;68(9):3152–60.
222. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell.* 2008 May 16;133(4):704–15.
223. Sorrentino A, Thakur N, Grimsby S, Marcusson A, Von Bulow V, Schuster N, et al. The type I TGF- β receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nat Cell Biol.* 2008;10(10):1199–207.
224. Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions: The importance of changing cell state in development and disease. Vol. 119, *Journal of Clinical Investigation.* 2009. p. 1438–49.
225. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. Vol. 15, *Current Opinion in Cell Biology.* Elsevier Ltd; 2003. p. 740–6.
226. Dalal BI, Keown PA, Greenberg AH. Immunocytochemical localization of secreted transforming growth factor- β 1 to the advancing edges of primary tumors and to lymph node metastases of human mammary carcinoma. *Am J Pathol.* 1993 Aug;143(2):381–9.
227. Buck MB, Fritz P, Dippon J, Zugmaier G, Knabbe C. Prognostic Significance of Transforming Growth Factor β Receptor II in Estrogen Receptor-Negative Breast Cancer Patients. *Clin Cancer Res.* 2004 Jan 15;10(2):491–8.
228. Inhibition of TGF- β With Neutralizing Antibodies Prevents Radiation-Induced Acceleration of Metastatic Cancer Progression - PubMed [Internet]. [cited 2020 Jan 7]. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28248204-inhibition-of-tgf-with-neutralizing-antibodies-prevents-radiation-induced-acceleration-of-metastatic-cancer-progression/?from_term=biswas%2C+guix%2C+rinehart&from_filter=pubt.review

&from_size=10

229. Osmond DG. Proliferation kinetics and the lifespan of B cells in central and peripheral lymphoid organs. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 1991 Apr [cited 2019 Jan 29];3(2):179–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2069745>
230. Lebman DA, Edmiston JS. The role of TGF-beta in growth, differentiation, and maturation of B lymphocytes. *Microbes Infect* [Internet]. 1999 Dec [cited 2019 Jan 29];1(15):1297–304. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10611758>
231. Sebestyén A, Barna G, Nagy K, Jánosi J, Paku S, Kohut E, et al. Smad signal and TGFbeta induced apoptosis in human lymphoma cells. *Cytokine* [Internet]. 2005;30(5):228–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15927846>
232. Douglas RS, Capocasale RJ, Lamb RJ, Nowell PC, Moore JS. Chronic lymphocytic leukemia B cells are resistant to the apoptotic effects of transforming growth factor-beta. *Blood* [Internet]. 1997 Feb 1 [cited 2019 Jan 29];89(3):941–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9028325>
233. Nagy P, Török N, Ladányi A, Kopper L. Expression of transforming growth factor-beta 1 in human non-Hodgkin's lymphoma xenografts. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 1991 Aug 21 [cited 2019 Jan 29];83(16):1174–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1886149>
234. Monajembashi S, Cremer C, Cremer T, Wolfrum J, Greulich KO. Microdissection of human chromosomes by a laser microbeam. *Exp Cell Res*. 1986;167(1):262–5.
235. Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, et al. Laser capture microdissection. *Science* (80-). 1996 Nov 8;274(5289):998–1001.
236. Liu A. Laser capture microdissection in the tissue biorepository. Vol. 21, *Journal of Biomolecular Techniques*. 2010. p. 120–5.
237. Von Eggeling F, Melle C, Ernst G. Microdissecting the proteome. Vol. 7, *Proteomics*.

2007. p. 2729–37.
238. Curran S, McKay JA, McLeod HL, Murray GI. Laser capture microscopy. Vol. 53, *Journal of Clinical Pathology - Molecular Pathology*. 2000. p. 64–8.
239. Gjerdrum LM, Lielpetere I, Rasmussen LM, Bendix K, Hamilton-Dutoit S. Laser-assisted microdissection of membrane-mounted paraffin sections for polymerase chain reaction analysis: Identification of cell populations using immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Mol Diagnostics*. 2001;3(3):105–10.
240. Maitra A, Gazdar AF. Tissue microdissection and processing. Vol. 106, *Cancer treatment and research*. 2001. p. 63–84.
241. Vandewoestyne M, Goossens K, Burvenich C, Van Soom A, Peelman L, Deforce D. Laser capture microdissection: Should an ultraviolet or infrared laser be used? *Anal Biochem*. 2013;439(2):88–98.
242. Zanni KL, Chan GK. Laser Capture Microdissection: Understanding the Techniques and Implications for Molecular Biology in Nursing Research Through Analysis of Breast Cancer Tumor Samples. Vol. 13, *Biological Research for Nursing*. 2011. p. 297–305.
243. Coudry RA, Meireles SI, Stoyanova R, Cooper HS, Carpino A, Wang X, et al. Successful application of microarray technology to microdissected formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagnostics*. 2007;9(1):70–9.
244. Fend F, Raffeld M. Laser capture microdissection in pathology. Vol. 53, *Journal of Clinical Pathology*. 2000. p. 666–72.
245. Banks RE, Dunn MJ, Forbes MA, Stanley A, Pappin D, Naven T, et al. The potential use of laser capture microdissection to selectively obtain distinct populations of cells for proteomic analysis - Preliminary findings. In: *Electrophoresis*. 1999. p. 689–700.
246. Leica. Laser Microdissection Microscopes Leica LMD6 & LMD7 [Internet]. [cited 2019 Aug 21]. Available from: <https://www.leica-microsystems.com/products/light->

247. Systems LM. Leica LMD6500 Leica LMD7000.
248. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2001;29(9):e45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328886>
249. Lackraj T, Goswami R, Kridel R. Pathogenesis of follicular lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol* [Internet]. 2018;31(1):2–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.beha.2017.10.006>
250. El-Sayed LH, Ghoneim HM, Abdel Rahman MA, Mohamed B, Abou Rawash SN, El-Kerm YM. Prognostic value of FOXP3 and TGF- β expression in both peripheral blood and lymph nodes in patients with B-Non Hodgkin's lymphoma. *Alexandria J Med* [Internet]. 2014;50(3):253–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajme.2013.07.003>
251. D'Arena G, Laurenti L, Minervini MM, Deaglio S, Bonello L, De Martino L, et al. Regulatory T-cell number is increased in chronic lymphocytic leukemia patients and correlates with progressive disease. *Leuk Res*. 2011 Mar;35(3):363–8.
252. Malpeli G, Barbi S, Greco C, Zupo S, Bertolaso A, Scupoli MT, et al. MicroRNA signatures and Foxp3 + cell count correlate with relapse occurrence in follicular lymphoma [Internet]. Vol. 9, www.oncotarget.com Oncotarget. 1996. Available from: www.oncotarget.com
253. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, Colomo L, Martinez A, Roncador G, et al. High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood* [Internet]. 2006 Nov 1 [cited 2017 May 9];108(9):2957–64. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2006-04-018218>
254. Hasselblom S, Sigurdadottir M, Hansson U, Nilsson-Ehle H, Ridell B, Andersson PO. The number of tumour-infiltrating TIA-1+ cytotoxic T cells but not FOXP3+ regulatory T cells predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*.

2007 May;137(4):364–73.

255. Baraka A, Salem HM. Clinical significance of T-regulatory cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Egypt J Immunol* [Internet]. 2011 [cited 2020 Jan 10];18(2):23–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23082467>
256. Altiok A, Ehlin-Henriksson B, Klein E. Correlation between the growth-inhibitory effect of TGF-beta 1 and phenotypic characteristics in a panel of B-cell lines. *Int J cancer* [Internet]. 1993 Aug 19 [cited 2019 Jan 29];55(1):137–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8393838>
257. Nakao A, Afrakhte M, Morén A, Nakayama T, Christian JL, Heuchef R, et al. Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF- β signalling. *Nature*. 1997;389(6651):631–5.
258. Letterio JJ. Murine models define the role of TGF- β as a master regulator of immune cell function. Vol. 11, *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2000. p. 81–7.
259. Labidi SI, Ménétrier-Caux C, Chabaud S, Chassagne C, Sebban C, Gargi T, et al. Serum cytokines in follicular lymphoma. Correlation of TGF- β and VEGF with survival. *Ann Hematol*. 2010 Jan;89(1):25–33.
260. Tvrdík D. The effect of TGFbeta1 on the expression and phosphorylation of key cell-cycle regulators in malignant B cells [Internet]. [cited 2020 Jan 7]. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15567975-the-effect-of-tgfbeta1-on-the-expression-and-phosphorylation-of-key-cell-cycle-regulators-in-malignant-b-cells/?from_single_result=The+effect+of+TGFbeta1+on+the+expression+and+phosphorylation+of+key+cell-cycle+regu
261. Husson H, Carideo EG, Neuberg D, Schultze J, Munoz O, Marks PW, et al. Gene expression profiling of follicular lymphoma and normal germinal center B cells using cDNA arrays [Internet]. 2002. Available from: <http://dfciwww.dfci>.
262. Huse K, Bakkebo M, Wälchli S, Oksvold MP, Hilden VI, Forfang L, et al. Role of Smad Proteins in Resistance to BMP-Induced Growth Inhibition in B-Cell Lymphoma. *PLoS One*. 2012;7(10):1–14.

263. Gratchev A. TGF- β signalling in tumour associated macrophages. *Immunobiology* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2018 Oct 25];222(1):75–81. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0171298515300966?via%3Dihub>
264. Bakkebo M, Huse K, Hilden VI, Forfang L, Myklebust JH, Smeland EB, et al. SARA is dispensable for functional TGF- β signaling. *FEBS Lett.* 2012;586(19):3367–72.
265. Wolfrain LA, Fernandez TM, Mamura M, Fuller WL, Kumar R, Cole DE, et al. Loss of Smad3 in acute T-cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2004 Aug 1;351(6):552–9.
266. DeCoteau JF, Knaus PI, Yankelev H, Reis MD, Lowsky R, Lodish HF, et al. Loss of functional cell surface transforming growth factor β (TGF- β) type 1 receptor correlates with insensitivity to TGF- β in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 May 27;94(11):5877–81.
267. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med.* 2001 Dec 3;194(11):1625–38.
268. Jelinek DF, Tschumper RC, Stolovitzky GA, Iturria SJ, Tu Y, Lepre J, et al. Identification of a Global Gene Expression Signature of B-Chronic Lymphocytic Leukemia. 2003.
269. Rooke HM, Vitas MR, Crosier KE. The TGF-type II receptor in chronic myeloid leukemia: analysis of microsatellite regions and gene expression [Internet]. Vol. 13, *Leukemia*. 1999 [cited 2020 Mar 22]. Available from: <http://www.stocktonpress.co.uk/leu>
270. Kuroda H, Matsunaga T, Terui T, Tanaka I, Takimoto R, Fujikawa K, et al. Decrease of Smad4 gene expression in patients with essential thrombocythaemia may cause an escape from suppression of megakaryopoiesis by transforming growth factor- β 1. *Br J Haematol.* 2004 Jan;124(2):211–20.
271. Zhang J, Zhang L, Cui H, Zhang X, Zhang G, Yang X, et al. High expression levels

- of SMAD3 and SMAD7 at diagnosis predict poor prognosis in acute myeloid leukemia patients undergoing chemotherapy. *Cancer Gene Ther.* 2019 May 1;26(5–6):119–27.
272. Dong M, Blobel GC. Review in translational hematology Role of transforming growth factor- β in hematologic malignancies. *Blood.* 2006;107(12):4589–96.
273. Capocasale RJ, Lamb RJ, Vonderheid EC, Fox FE, Rook AH, Nowell PC, et al. Reduced surface expression of transforming growth factor β receptor type II in mitogen-activated T cells from Sézary patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Jun 6;92(12):5501–5.
274. A Deletion in the Gene for Transforming Growth Factor Beta Type I Receptor Abolishes Growth Regulation by Transforming Growth Factor Beta in a Cutaneous T-cell Lymphoma - PubMed [Internet]. [cited 2020 Mar 22]. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10515889/?from_single_result=Schiemann+WP%2C+Pfeifer+WM%2C+Levi+E%2C+Kadin+ME%2C+Lodish+HF.Adeletion+in+the+gene+for+transforming+growth+factor+beta+type+I+receptor+abolishes+growth+regulation+by+transforming+growth+factor+beta+in+a+cutaneousT-cell+lymphom
275. Sebestyén A, Barna G, Nagy K, Jánosi J, Paku S, Kohut E, et al. Smad signal and TGF β induced apoptosis in human lymphoma cells. *Cytokine.* 2005 Jun 7;30(5):228–35.
276. Muñoz O, Fend F, de Beaumont R, Husson H, Astier A, Freedman AS. TGF β -mediated activation of Smad1 in B-cell non-Hodgkin's lymphoma and effect on cell proliferation. *Leukemia.* 2004;18(12):2015–25.
277. Haque S, Morris JC. Transforming growth factor- β : A therapeutic target for cancer. *Human Vaccines and Immunotherapeutics Taylor and Francis Inc.;* Aug 3, 2017 p. 1741–50.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Şenay Köm

Doğum Yeri: Antakya

Doğum Tarihi: 08.07.1986

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce, Almanca (başlangıç seviyesinde)

Eğitim Durumu

Lise: Selim Nevzat Şahin Anadolu Lisesi- Hatay-2004

Lisans: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi-Eskişehir Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji – 2005-2009

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi-Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans – 2010/2013

Doktora: Ankara Üniversitesi-Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji Doktora Programı – 2013/2020

İş Tecrübesi

1- **Kurumu:** Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

Görev: Biyolog

Yılları: 2013-2019

2- **Kurumu:** Labgen Laboratuvar Sistemleri San. ve Tic. A.Ş.

Görev: Aplikasyon Uzmanı

Yılları: 2019-Halen

Yayınlar ve Bildiriler

1-Dizbay, Sak S., oşkun, Ö., **Boyacıgil, Ş.**, Ceyhan K., Akciğer Kanserinde EGFR Mutasyonu. 23.Ulusal Patoloji Kongresi, 2013, İzmir, Türkiye

2-**Boyacıgil, Ş.**, Alakoç, YD., Karabulut, Y., Doğanay, B., Gürman, G., Kuzu, I., Evaluation of the Amount of the Neoplastic Clone in the Bone Marrow Samples of Myeloproliferative Disorders and its Relation with the Disease Status, 4th International Congress on Leukemia Lymphoma Myeloma, 2013, İstanbul, Türkiye

3-**Boyacıgil, Ş.**, oşkun, Ö., Musayeva, M., Ceyhan, K., Sak, SD., Akciğer Kanserinde EGFR Mutasyon Profili: AÜTF Deneyimi, XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Fethiye, 2015, Türkiye

4-Kosemehmetoglu, K., Kaygusuz, G., Fritchie, K., Aydın, O., Yapicier, O., Coskun, O., Karatayli, E., **Boyacıgil, S.**, Guler, G., Dervisoglu, S., Kuzu, I. Clinical And Pathological Characteristics Of Gastrointestinal Stromal Tumor (G1st) Metastatic To Bone. Virchows Archiv, 2017. Doi:10.1007/S00428-017-2138-7.

9. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

**4th International Congress on
Leukemia – Lymphoma – Myeloma**

May 22 – 25, 2013 • Istanbul, Turkey

ABSTRACTS

essential thrombocythemia diagnosed according WHO classifications were treated with Interferon-Alfa 2b subcutaneous. Treatment scheme was consisted of two phases: a) induction phase with interferon alpha 3million units (MU) per day and b) a maintenance phase. The pretreatment mean platelet counts were $923 \times 10^9/l$ and megacariocytes in bone marrow were increased in all cases. Splenomegaly was present in 15% of the patients, and 5pts have had vascular complication like thrombosis in pretreatment phase.

Results: During the induction phase, the results showed that using 21MU of IFN Alfa weekly (3MU/day) platelet counts were $500 \times 10^9/l$ in 100% of the patients. During the maintenance phase 25pts required 3MU three times a week, and 10 pts required 9MU three times a week. V617F mutation of JAK2 gene was positive in 17pts. During a long-term treatment of 5 years subjective side effects were tolerable. Until now 31 pts have stable platelet counts below $500 \times 10^9/l$ and only 2 had died because of acute myocardial infarction and two had died because of acute mesenteric thrombosis.

Conclusions: We conclude that Interferon-Alfa can correct thrombocytosis in pts with essential thrombocythemia over a period of years and prevent morbidity attributable to this disease.

Keyword: Essential thrombocythemia, Interferon-Alfa

Poster No: 00107

Abstract:0313

EVALUATION OF THE AMOUNT OF THE NEOPLASTIC CLONE IN THE BONE MARROW SAMPLES OF MYELOPROLIFERATIVE DISORDERS AND ITS RELATION WITH THE DISEASE STATUS

Senay Boyacıoğlu¹, Yeşim Doğan Alakoç², Yasemin Yuyucu Karabulut¹, Beyza Doğanay Erdoğan³, Günhan Gürman⁴, Işın Kuzu¹

¹Ankara University School of Medicine, Department of Pathology, Ankara

²Ankara University Institute of Biotechnology, Ankara

³Ankara University School of Medicine, Department of Biostatistics

⁴Ankara University School of Medicine, Department of Haematology

Biology and disease status of Myeloproliferative disorders (MPD) can be interpreted by the amount of neoplastic clone. This evaluation can be made on JAK2 mutated cases by using sensitive molecular methods.

In this study, we aimed to investigate JAK2 exon 14 (JAK2V617F), JAK2 exon 12 and MPLW515L, MPLW515K, MPLA506T and MPLA519T mutations, on pathology archival material using Next Generation Sequencing Technologies. The amount of the mutated clone was compared with the histopathological parameters and the clinical data in order to evaluate the relationship between disease presentation and the "allele burden" status on bone marrow samples. For this purpose, the bone marrow biopsies and smears of 56 patients with median age 57,8 (22-80) (45,8% male, 54,2% female) diagnosed as MPD (ET, PV, PMF) between 2001-2011 in Ankara University Faculty of Medicine Department of Pathology were selected for the study. The clinical and laboratory data were collected from the hospital records. Roche 454 GS Junior system was performed for detection of JAK2 and MPL mutations sequencing.

Our series showed compatible age, gender and laboratory findings with the stages of the disease groups.

JAK2 exon 14 V617F mutation was examined in %79,2 of the patients (ET 84,2%, PV 91,7%, PMF 64,7%). One of the cases carried JAK2 exon 12 mutation. MPL exon 10 mutation was examined only on one ET case (%2,9) case also carrying JAK 2 exon 14 mutation. "Allele burden" which represents the amount of JAK2V617F mutated clone ratio was lowest among PMF cases, followed by ET. The ratio was highest among PV cases. A positive relation between cellularity ($p=0.032$), white blood cell count ($p=0.007$) and allele burden status was examined. The amount of mutated allele was less than %10 for five patients.

Our results confirmed that the ratio of Jak mutated cases for different clinical presentations of MPD is higher than the literature when the bone marrow samples were examined by pyrosequencing. Cellularity in the bone marrow biopsies and white blood cell count in blood are the most reliable reflectors of the amount of neoplastic clone for MPD as expected.

Keyword: MPD, Jak2 mutation

Poster No: 00108

Abstract:0327

PATHOPHYSIOLOGY OF PLATELET MEDIATED THROMBOSIS AND BLEEDING IN THROMBOCYTHEMIA

Jan Jacques Michiels¹, Alain Gadisseur²
¹Goodheart Institute Rotterdam, Netherlands
²University Hospital Antwerp, Belgium

Erythromelalgic thrombotic thrombocythemia (ETT), caused by a thrombotic occlusion of the acral digital (erythromelalgia) and the cerebral end-arterial circulation (migraine-like microvascular cerebral transient ischemic attack; MIAs) are the far most frequent aspirin-sensitive microvascular complication in ET and PV. If left untreated, major thrombosis of the peripheral, cerebral and the coronary circulation do occur usually in the absence of pre-existing vascular disease as a main cause of death. In cases of reactive thrombocytosis, erythromelalgia, MIAs and major thrombosis do not occur, indicating not only a quantitative but also a qualitative hypersensitive platelet defect in thrombocythemia. It is postulated that hypersensitive platelet in thrombocythemia are caused by the JAK2V617F or MPL515 gain of function mutations in thrombocythemia. Correction of the hematocrit to normal in PV (<42 in female, < 0.45 in male) on top of low dose aspirin or reduction of platelet number in ET and PV to normal by platelet by agents (interferon or anagrelide) reduces the minor and major thrombotic complication to near zero. An association between spontaneous hemorrhages and pronounced thrombocythemia (hemorrhagic thrombocythemia: HT) is caused by an acquired von Willebrand Disease (AVWS due to platelet induced proteolysis of the von Willebrand factor (VWF)) at platelet counts in excess of $1000 \times 10^9/l$. Correction of the platelet counts to below $1000 \times 10^9/l$ alleviates bleeding and largely corrects the AVWS-defect. Reduction of platelet count to near normal or normal is associated with the complete relief of bleeds, but the risk on aspirin preventable minor erythromelalgic ischemic distress and major thrombosis persist in ET and PV patients. The von Willebrand factor (VWF) is the link to explain the paradoxical occurrences of both ETT and HT at the same time in one the same ET or PV patient. We hypothesize and could produced good evidence, that interactive activation of hypersensitive platelet/ADAMTS13/VWF complex formation at high shear stress in the end-arterial microcirculation does



PS-01 43

Akciğer kanserinde EGFR mutasyon profili: AÜTF deneyimi

Boyarıcıll Senay¹, Coşkun Öznu², Musayeva Melahet², Ceyhan Koray², Düzbay Sak Serpil²

¹Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara

²Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji ABD, Ankara

Akciğer kanseri, en çok ölüme yol açan kanserdir. Adenokanserler başta olmak üzere küçük hücreli dış akciğer kanserlerinin (KHDAK) %10-20'sinde EGFR mutasyonları bildirilmiştir. Bunların %90'ı ekzon 19 (delesyonlar) ve 21'de (nokta mutasyonları) gözlenmektedir. Bu mutasyonlar EGFR tirozin kinaz inhibitörlerine (erlotinib/gefitinib) cevapla ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmada, ülkemizdeki KHDAK'da EGFR mutasyon profilinin saptanması ve literatürle karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca yaş, cinsiyet, DNA kalitesi, kullanılan materyal tipini içeren parametrelerle mutasyon durumu arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bölümümüze başvurmuş 436 KHDAK hastasına ait rezeksiyon, biyopsi ve aspirasyon materyalinden izole edilen DNA'lar kullanılmıştır. DNA degradasyon düzeyinin kontrolü için size ladder PCR yapılmıştır. Sanger sekanslama yöntemi ile EGFR ekzon 18, 19, 20 ve 21 bölgeleri taranmıştır. EGFR mutasyon analizi yapılan olguların % 92'sinde (n:401) analiz başanlı olmuştur. Bunların %67'si formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş (FFPE) rezeksiyon, biyopsi veya hücre bloğu; % 33'ü yayma preparatlarından oluşmaktadır. Olguların % 12.2'sinde (FFPE materyalin % 13.4'ü, sitolojik materyalin % 9.8'i) mutasyon saptanmıştır. Analiz yapılan hastaların %75'i erkek ve %25'i kadın iken; mutasyonlu olguların % 40.8'i erkek, %59.2'si kadındır. 49 olguda izlenen toplam 52 mutasyonun % 3.8'i (n:2) ekzon 18, % 55.8'i (n:29) ekzon 19, % 7.7'si (n:4) ekzon 20, % 32.7'si (n:17) ekzon 21'dedir. İzlenen mutasyonlar arasında literatürde nadir olarak tanımlanan mutasyonların oranının %13.5 (n:7) olduğu dikkati çekmiştir. Olgularımızın %74.3'ünde (n:298) Q787Q SNP saptanmıştır. Serimizde sitolojik materyalde analiz başarısının FFPE materyale oranla daha yüksek (%95.7 vs. 90.3) olduğu saptanmıştır. İzlenen mutasyonlar ve cinsiyet dağılımı literatürle uyumlu olmakla birlikte; nadir mutasyonların varlığı, tüm değişiklikleri saptayan bir yöntem olan sekanslamanın EGFR analizinde en uygun yöntem olduğunu düşündürmektedir.

EGFR mutation profile in lung cancer: AÜTF experience

Boyarıcıll Senay¹, Coşkun Öznu², Musayeva Melahet², Ceyhan Koray², Düzbay Sak Serpil²

¹Ankara University, Biotechnology Institute, Ankara

²Ankara University, School of Medicine, Department of Medical Pathology, Ankara

Non-small cell lung cancer (NSCLC), adenocarcinoma in particular, carries EGFR mutations in 10-20% of cases. 90% of mutations are observed in exons 19&21. These mutations are associated with response to EGFR tyrosine kinase inhibitors (gefitinib/erlotinib). In this study, we aimed to detect EGFR mutation profile in our country and investigate the relationships between the mutation status and some parameters including age, gender, DNA quality, material type. We examined material (resection, biopsy, cytological) from 436 NSCLC patients for EGFR mutation status. Exons 18, 19, 20 and 21 were screened by Sanger sequencing. EGFR mutation analysis was successful in 92% (n:401) of the cases. 67% of our cases were formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) material and 33% was cytological material. Mutations were detected in 12.2% of cases (13.4% of FFPE, 9.8% of cytology material). Our patients consisted of 300 men and 101 women. Mutations were detected in 40.8% of male and 59.2% of female patients. We observed a total of 52 mutations in 49 patients [2 in exon 18 (%3.8), 29 in exon 19 (55.8%), 4 in exon 20 (7.7%) and 17 in exon 21 (32.7%).]. Rare mutations consisted 13.5% of mutations. In 77.2% of the cases, Q787Q SNP in exon 20 was detected. In this series, the yield of cytology was higher than that of FFPE material (95.7% vs. 90.3%). The mutation profile and gender distribution was consistent with the literature. However, presence of rare mutations suggests that sequencing, which can detect all alterations, is a suitable method for EGFR mutation analysis.

PS-01 44

Let-7c'nin Otofaji Üzerine Etkisinin MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hatında Araştırılması

Demiral Sevil¹, Kırkeş Sevil¹, Ulaşlı Mustafa¹, Gürses Serdar², Öztuzu Serdar¹, Eroğlu Sevil¹, Camcı Celalettin³, Çakmak Ecir Ali², Arslan Ahmet¹


¹Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim dalı, Gaziantep, Türkiye.

²Zirve Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim dalı, Gaziantep, Türkiye.

³Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji Anabilim dalı, Gaziantep, Türkiye.

Otofaji, uzun ömürlü proteinlerin, hasarlı organellerin ve katlanmamış proteinlerin oluşturduğu agregatların yıkımı için var olan lizozomal katabolik bir yoldur. Otofajinin, kanser, diyabet, otoimmün ve nörodegeneratif hastalıklar gibi birçok hastalıkta rol oynadığı bilinmektedir. miRNA lar, 21-25 nükleotid uzunluğunda kodlamayan RNA'lardır. Çeşitli kanser tiplerinde miRNA ifadesinde düzensizlikler olduğu gösterilmiş ve bu düzensizlikler, karsinogenez, ilaç direnci ve metastaz ile ilişkilendirilmiştir. Bu açıdan miRNA'lar tarafından düzenlenen hedef genlerin belirlenmesi, yeni kanser tedavileri geliştirmek açısından önemlidir. Yapılan ön çalışmada

Clinical and pathological characteristics of gastrointestinal stromal tumor (GIST) metastatic to bone

Kemal Kosemehmetoglu¹  · Gulsah Kaygusuz² · Karen Fritchie³ · Ovgu Aydın⁴ · Ozlem Yapicier⁵ · Ozgur Coskun² · Ersin Karatayli⁶ · Senay Boyacigil² · Gulnur Guler⁷ · Sergulen Dervisoglu⁴ · Isinsu Kuzu²

Received: 19 December 2016 / Revised: 11 March 2017 / Accepted: 26 April 2017 / Published online: 9 May 2017
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

Abstract Our aim in this study was to describe the clinical, morphological, and molecular profile of gastrointestinal stromal tumor (GIST) metastatic to bone. We analyzed the morphological, phenotypic, and molecular characteristics of seven cases, and in addition reviewed 17 cases from literature. Sequence analysis of *KIT* and *PDGFRA* genes was possible for six cases. For the GIST cases with bone metastasis, the most common primaries were small intestine (29%), stomach (25%), and rectum (21%). Sites of bone metastases were vertebrae (11), pelvis (8), femur (8), ribs (6), humerus (5), skull (3), scapula (1), and mandible (1). The size ranged from 1.5 to 13 cm (median, 3.8 cm). Bone metastases without involvement of any other organ were seen in 17% of the cases and

were solitary in 14 (58%). Adjacent soft tissue involvement was present in nearly half of the patients. Bone metastasis was either manifest at the time of diagnosis (28%) or occurred after a mean period of 4.7 years (3 months–20 years). Morphologically, neoplastic cells were spindle in 67%, epithelioid in 13%, and mixed epithelioid and spindle in 20%. CD117, DOG1, and CD34 were positive in 88, 86, and 85% of the cases, respectively. *KIT* Exon 11 mutations were the most frequent gene alteration (78%), followed by *KIT* Exon 13 mutations. Of 17 of the cases with available follow-up information, 7 (41%) patients developed bone metastasis under imatinib therapy. Five patients (29%) died of disease within a mean of 17 months. Bone metastases from GIST are usually found in patients with advanced disease and typically present as lytic masses with occasional soft tissue involvement. We could not identify any *KIT* or *PDGFRA* alterations predisposing to bone metastasis.

Kemal Kosemehmetoglu and Gulsah Kaygusuz equally contributed to the study.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00428-017-2138-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Keywords Gastrointestinal stromal tumor · Bone metastasis · Mutation · DOG1 · *KIT* · *PDGFRA*

✉ Kemal Kosemehmetoglu
dokemal@hotmail.com; kemal.kosemehmetoglu@hacettepe.edu.tr

Introduction

Gastrointestinal stromal tumor (GIST) is the most common mesenchymal tumor of the gastrointestinal tract. It may also rarely present in extra-gastrointestinal locations such as mesentery, retroperitoneum, and omentum, and is then referred to as extra-gastrointestinal stromal tumor (EGIST) [1]. Although nearly 50% of malignant GISTs present with metastasis and the vast majority of the patients develop metastasis in liver or peritoneum within 2 years, bone metastases seem to be quite uncommon, occurring in less than 5% of cases [2–5]. As clinical guidelines do not recommend routine bone explorations at diagnosis or during therapy, pathologists rarely encounter

¹ Department of Pathology, Hacettepe University School of Medicine, Ankara, Turkey

² Department of Pathology, Ankara University School of Medicine, Ankara, Turkey

³ Department of Laboratory Medicine and Pathology, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA

⁴ Department of Pathology, Istanbul University Cerrahpasa School of Medicine, Istanbul, Turkey

⁵ Department of Pathology, Acibadem University School of Medicine, Istanbul, Turkey

⁶ Hepatology Institute, Ankara University, Ankara, Turkey

⁷ Ankara, Turkey

GIST metastasis to bone. Hence, they may have difficulties diagnosing bone metastasis of GIST, unless relevant clinical information is available.

A mutation in one of two receptor tyrosine kinase genes (*KIT* and *PDGFRA*) is the key event in the pathogenesis of most GISTs (85–90%). *KIT* and *PDGFRA* mutations vary in type and complexity. The primary mutation is in *KIT* exon 9 (8% of cases), exon 11 (65%), exon 13 (1%), exon 17 (1%), and *PDGFRA* exon 12 (2% of cases), exon 14 (<0.5%), and exon 18 (8%) [6]. Location of primary tumor, size, and mitotic activity are risk factors associated with outcome, and efforts are ongoing to establish morphological and prognostic correlates with specific types of mutation [7–9]. As there are only single case reports or small series on GISTs with bone metastasis in the literature [10–22], their clinicopathological characteristics and mutational profile are not well characterized. In this multicenter study, we collected seven cases of GIST with bone metastasis, analyzed their morphology and gene aberration profile, and reviewed the literature.

Material and methods

Case selection

Seven cases were retrieved from the pathology archives of four referral hospitals. One of these cases (case 5) was previously reported without data regarding its gene mutation status [23]. Available clinical data were investigated from the hospital databases or patient files. H&E-stained slides of all cases were reviewed by two pathologists (KK and GK), and morphological features were recorded with available immunohistochemical findings.

To support the diagnosis of GIST, DOG1 staining was performed (Cell Marque, SP31, 1/200 Ventana ultraView detection kit with DAP chromogen with Ventana BenchMark XT automated immunostainer, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) in six cases (case no. 7 could not be included due to lack of a paraffin block). Results of other immunostainings were obtained from pathology reports.

The English Literature was searched in PubMed for GISTs with bone metastasis, using keywords “gastrointestinal stromal tumor” and “bone metastasis” in the period before 2014. Full texts of all case reports were critically reviewed regarding the diagnosis of GIST. The reports without morphological documentation were discarded. All available clinical, radiological, and pathological findings, including immunohistochemical and molecular data, were recorded.

Analysis of *KIT* and *PDGFRA* mutations

Mutation analyses for *KIT* gene exons 9, 11, 13, and 17 and *PDGFRA* gene exons 12, 14, and 18 were performed in six

cases using PCR amplification and direct sequencing of the amplified products. In three cases, both primary tumors and their bone metastases were available for investigation of mutation analysis. Five unstained 10- μ -thick tissue sections were used for DNA extraction. DNA was isolated by using QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen Incorporated, Valencia, CA, USA), and a sufficient amount of DNA of appropriate quality was obtained in all cases. Following PCR amplification by primers specific for *KIT* exons 9, 11, 13, and 17 and *PDGFRA* exons 12, 14, and 18, the PCR products were cleaned up by ExoSAP-IT® (GML Corporation, Wollerau, Switzerland). Sequencing of the amplified fragments was done with a PCR reaction of 25 cycles of 10 s at 94 °C, 5 s at 50 °C, and 4 min at 60 °C using BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The samples were run in either ABI 310 Automated Sequencer or in ABI 3130xl Genetic Analyzer. The identified DNA sequence alterations were confirmed by sequencing of both DNA strands in two independent experiments. The sequences were compared with the sequences of the genes in the NCBI Blast DNA bank. Molecular analyses were interpreted by five authors (GK, IK, EK, SB, and OC).

In order to confirm the validity of mutations and increase the sensitivity of detection for some cases, next-generation sequencing was performed using a Roche 454 GS Junior platform (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) in those cases of which material was available. Firstly, primers were designed for *KIT* exons 9, 11, 13, and 17, including 454 adaptors and multiplex identifiers (MIDs). PCR was performed using these primers with MIDs. Then, PCR products were pooled and purified with Agencourt AMPure XP kit (Beckman Coulter, Indianapolis, IN) and purified PCR products were quantified by Quant-iT PicoGreen Assay (Life Technologies, Grand Island, NY). Lastly, emulsion PCR and bead recovery assays were performed according to the manufacturer's instructions. For sequencing assay, 454 GS Junior Titanium reagents were used. NGS data was analyzed by JSI SeqPilot Version 4.0.1 build 502 program.

Results

Meta-analysis of previously reported series with cases of the present study

Table 1 summarizes the clinicopathological and immunohistochemical features of current and previously reported GISTs metastatic to bone. Together with seven newly presented cases, a total of 24 cases were recorded. These cases occurred in 10 women and 13 men, with a median age of 61 years (range, 40–92 years). Small intestine (seven cases, 29%) and stomach (six cases, 25%) were the most common

Table 1 Clinicopathological findings in the current and previously reported 28 cases in literature

	Age at bone metastasis/s/sex	Metastatic site/size (cm)	Primary site/duration till bone metastasis	Radiology	Histopathology of metastatic tumor	AFIP risk group ^a
Kowemehmetoglu et al.						
Case no. 1	82 F	Right mandible, 2.3	Ileum, 5 years	CT: expansile destructive lytic mass with moderate contrast enhancement X-ray: lytic mass	Spindle cells with moderate cellular atypia and epithelioid cells with eosinophilic to clear cell cytoplasm and prominent nucleoli Epithelioid and spindle cells with prominent hyperchromasia and pleomorphism, scattered tumoral giant cells	Moderate High*
Case no. 2	52 F	Right humerus, N/A	Liver?, N/A		Intersecting fascicles of monotonous spindle cells showing storiform and hemangiopericytic pattern. Focal myxoid degeneration and scattered cells with nuclear atypia	High
Case no. 3	61 F	Left hip periprosthetic, 11	Menstruary of small intestine and ovary, 4 years	MRI: peripheral contrast enhancing, solid-cystic	Well-circumscribed, spindle, accompanying osteoclast-type giant cells	High
Case no. 4	53 M	Right scapula, 13	Rectum, 9 years	MRI: T1A and T2A heterogeneously hypointense, partially contrast enhancing		High
Case no. 5	76 F	Right chest wall (6th rib); 8.6	Rectovaginal septum, 20 years	Prominent subpleural mass in the right upper lung posteriorly involving both the upper lobe, superior segment of the right lower lobe, and posterior right 7th rib. Lytic lesion in the proximal shaft of the right femur with endosteal scalloping	Epithelioid, spindle and myxoid areas. Epithelioid cells forming pseudoglandular structures within a myxoid, hyalinized matrix and intersecting long bundles with focal storiform pattern	High
Case no. 6	66 F	Right femur, N/A	Ovary, 7 years		Hypocellular neoplasm of spindle cells with moderate nuclear atypia within a prominent hyalinized matrix	High*
Case no. 7	67 M	Right rib, N/A	N/A	N/A	Epithelioid cells with round to oval nuclei and indistinct cytoplasmic borders	N/A
Abuzakham et al. 2011	61 F	Left humerus, N/A	Jejunum, 4 years	CT: lytic lesion leading to pathological fracture CT and MRI: lytic mass involving sella and R cavernous sinus	Intersecting fascicles of spindle cells	Moderate
Beeg et al. 2010	70 M	Clivus, 0	Stomach, 10 years		Spindle cell	High
Bejel et al. 2009	85 M	N/A (bone marrow bx), N/A	Unidentified	N/A	Spindle cell with loose palisading arrangement	N/A
Barrière et al. 2009	57 M	Clivus and spine, N/A	Rectum, 0	MRI: T1 hypointense, T2 hyperintense, heterogeneous contrast enhancement	Highly vascularized spindle cell	High
Gil-Arnaiz et al. 2009	65 M	Right frontotemporal bone, 4	Rectum, 1 year	MRI: contrast enhancing lytic infiltrative mass	Spindle cell	High
Jati et al. 2012	49 M	Spine, rib, pelvis, humerus, femur, 0.2–1.5	3 months–6 years Stomach	Fracture in 2 patients Lytic	N/A	High
Case no. 2	71 M	Spine, rib, pelvis, humerus, femur, 0.4–4.0	Rectum	Lytic	N/A	High
Case no. 3	52 F	Spine, rib, pelvis, 0.9–3.6	Stomach	Lytic with fracture MRI: T1 hypointense, T2 hyperintense lytic mass	Spindle cell	High

Table 1 (continued)

	Age at bone metastasis/sex	Metastatic site/size (cm)	Primary site/duration till bone metastasis	Radiology	Histopathology of metastatic tumor	AFIP risk group ^a
Case no. 4	48 M	Spine, 3.0	Stomach	Lytic	N/A	High
Case no. 5	51 M	Rib, femur, 0.5–3.0	Stomach	Lytic	N/A	High
Case no. 6	60 M	Pelvis, 4.0	Jejunum	Lytic	N/A	High
Ozcan et al. 2010	53 M	Right humerus, N/A	Esophagus, 0	MRI: T1 hypointense, T2 hyperintense lytic mass	Primary: Epithelioid and spindle cells	High
Polepajo-Nicolas et al. 2006	47 F	L3 vertebra, 2.7 cm	Jejunum, 0	Lytic	Spindle cells in collagenous and myxoid matrix	High
Di Scioio et al. 2011						
Case no. 1	62 M	Spine, pelvis, ribs, N/A	Item, 0	CT: lytic	N/A	Moderate/High
Case no. 2	82 F	Spine, pelvis, N/A	Duodenum, 0	CT: lytic	N/A	High
Case no. 3	54 F	Spine, ilium, ribs, N/A	Duodenum, 7 years	CT: lytic with fractures	N/A	High
Slimack et al. 2012	40 M	T2–3 and L3 vertebrae, N/A	Duodenum, 3 years	MRI: T1 hyperintense contrast enhancing lytic mass	Trabeculi of epithelioid cells in hemorrhagic and collagenized background	N/A
Soft tissue involvement						
					Treatment of bone metastasis	Outcome
Koemeltmetoglu et al.						
Case no. 1	Yes	KIT+ DOG1+ CD34+ SMA focal+	<i>P</i> : None <i>S</i> : KIT Exon 11 Complex Del/ins at codons 555556,565568 <i>P</i> : KIT exon 13 K642E <i>S</i> : KIT exon 13 K642E + Base changes in KIT intron 10 (IVS11-15C/A)	Resection	Curettage and excision Imatinib (400 mg)	No other met with PET/CT; AWD
Case no. 2	No	KIT+ DOG1+ CD34+S100- EMA focal + - for SMA, panCK, ICA	<i>P</i> : KIT exon 13 K642E <i>S</i> : KIT exon 13 K642E + Base changes in KIT intron 10 (IVS11-15C/A)	Imatinib	Curettage Sunitinib	Hepatic insufficiency within 5 months
Case no. 3	Yes	KIT+ DOG1+ CD34+ SMA focal+ - for desmin, S100	<i>P</i> : KIT Exon 11 (V599D) <i>S</i> : KIT Exon 11 (Q556_K558delins)	Resection Chemotherapy	Excision Imatinib	Liver, peritoneum, lung mets; AWD 15 months
Case no. 4	Yes	KIT+ DOG1+ CD34+ - for SMA, S100, panCK	<i>P</i> : N/A <i>S</i> : KIT exon 11 (K558_V559TT+) KIT exon 11W582+ KIT Exon 13 (K642E)	Resection Imatinib (400 mg)	Excision Sunitinib (50 mg)	Liver met; AWD for 2 years
Case no. 5	Yes	KIT+ DOG1+ CD34+ PKC-β focal+ PDGFR β+ - for SMA, desmin, S100	<i>P</i> : N/A <i>S</i> : KIT Exon 11 (W557_558del)	Radiotherapy Resection	Excision with tumor-free margins Imatinib	Vertebral body mets; DOD 2 years

Table 1 (continued)

Case no.	Soft tissue involvement	Immunohistochemistry	Molecular features (P: primary, S: secondary)	Treatment of primary tumor	Treatment of bone metastasis	Outcome
Case no. 6	No	KIT+ DOG1+	P: N/A S: WT	Resection Radiotherapy Chemotherapy Imatinib (400–800 mg) N/A	Intramullary nodding Radiotherapy	No follow-up after femur fixation N/A
Case no. 7	N/A	KIT+ DOG1–	N/A	Resection Imatinib (400 mg after liver met)	Sunitinib Radiotherapy	Liver, lung mets; DOD 6 months
Abuzakhan et al. 2011	Yes	KIT– CD34– Bcl2– (CD34 and KIT+ in primary)	P: KIT Exon 11 del559V–560V N/A	Resection Imatinib (400 mg after liver met) Sunitinib (50 mg)	Sunitinib Radiotherapy	Liver, lung mets; DOD 6 months
Basg et al. 2010	No	KIT+ CD34+	N/A	Sunitinib (50 mg)	Subtotal excision Imatinib Imatinib	Liver and lung met; AWD 2 months Regression and AWD 6 months
Bajel et al. 2009	No	KIT+ CD34+ CD34+ Vincentin+ – for PanCK, S100, lymphoma markers	N/A	N/A	Imatinib (400 mg) Sunitinib (50–37.5 mg) Radiotherapy Nilotinib (400 mg)	Liver met; DOD 18 months with lung met
Barrière et al. 2009	No	KIT+ CD34+ Vincentin+ H-caldesmon+ – for panCK, S100, CD31, SMA, desmin	N/A	Palliative partial resection	Imatinib (400 mg)	Relapse after 13 months
Gil-Argaiz et al. 2009	Yes	Primary KIT+ CD34+ SMA focal+ H-caldesmon+ S100– KIT	N/A	N/A	Imatinib (400 mg)	Relapse after 13 months
Jari et al. 2012	Yes	Primary KIT+ CD34+ SMA focal+ H-caldesmon+ S100– KIT	N/A	In 1 case, bone metastasis occurred during imatinib therapy	Imatinib given after bone metastasis in 5 cases	Liver, spleen, pelvis, lymph node, soft tissue mets; Regression Liver, pelvis mets; Progression Liver, pelvis mets
Case no. 1	No	Primary KIT+ CD34+ SMA focal+ H-caldesmon+ S100– KIT	N/A	N/A	N/A	Liver, spleen, pelvis, lymph node, soft tissue mets; Regression
Case no. 2	Yes	Primary KIT+ CD34+ SMA focal+ H-caldesmon+ S100– KIT	N/A	N/A	N/A	Liver, spleen, pelvis, lymph node, soft tissue mets; Regression
Case no. 3	Yes	Primary KIT– CD34+ SMA focal+ H-caldesmon+ S100– KIT	N/A	N/A	N/A	Liver, spleen, pelvis, lymph node, soft tissue mets; Regression
Case no. 4	Yes	Primary KIT+ CD34+ SMA focal+ H-caldesmon+ S100– KIT	N/A	N/A	N/A	Liver, spleen, pelvis, lymph node, soft tissue mets; Regression
Case no. 5	No	Primary KIT+ CD34+ SMA focal+ H-caldesmon+ S100– KIT	N/A	N/A	N/A	Liver, spleen, pelvis, lymph node, soft tissue mets; Regression
Case no. 6	No	Primary KIT+ CD34+ SMA focal+ H-caldesmon+ S100– KIT	N/A	N/A	N/A	Liver, spleen, pelvis, lymph node, soft tissue mets; Regression

Table 1 (continued)

	Soft tissue involvement	Immunohistochemistry	Molecular features (P: primary, S: secondary)	Treatment of primary tumor	Treatment of bone metastasis	Outcome
Ozan et al. 2010	No	KIT+ Primary KIT+ CD34+	N/A	Imatinib (400 mg)		Lung met; Partial regression
Policarpo-Nicolas et al. 2006	Yes	KIT+ CD34+ – for panCK, desmin, SMA	N/A	Resection Imatinib	Imatinib	Lymph node met; NED 10 months
Di Scio et al. 2011	No	Liver met KIT+ CD34+	N/A		Imatinib (400 mg) Radiotherapy Sunitinib	Liver met; DOD 3 years
Case no. 1	No	S100– Primary KIT+ CD34+	P: KIT exon 11 c.1696_1718del (p.N566_P573delinsA)	Resection Imatinib (400–800 mg) Sunitinib (37.5 mg)		Liver met; AWD 4 years
Case no. 2	Yes	Primary KIT+ CD34+	P: KIT exon 11T>A 69429 (p.V5594)	Resection Imatinib (400–800 mg) Sunitinib (37.5 mg)		Liver met; DOD 6 months
Slimack et al. 2012	Yes	KIT+ CD34+ – for S100, EMA, desmin	N/A	Resection Imatinib	Excision	Liver met (resected); AWD 2 years

* For EGISTs [34]

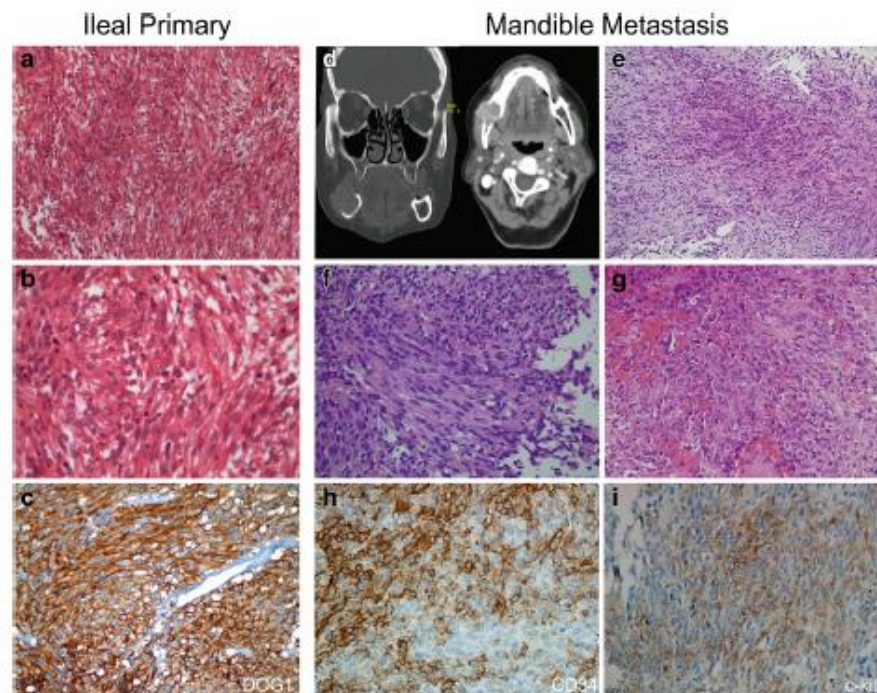


Fig. 1 Case no. 1. **a, b** Ileal tumor was composed of monotonous short fascicles of spindle cells ($\times 200$ and $\times 400$). **c** Neoplastic cells were positive for DOG1 ($\times 200$). **d** Computer tomography revealed a solitary mass at the right mandible. **e, f** Mandibular metastasis of GIST was

composed of spindle cells similar to its primary ($\times 100$ and $\times 400$). **g** Epithelioid areas were only present in metastatic focus ($\times 400$). Neoplastic cells were positive for CD34 (**h**) and CD117 (**i**) ($\times 400$)

were also seen in a minority of the cases. GISTs commonly metastasize to liver and peritoneum, and about 5% of the metastases are found in unusual locations, such as bone, soft tissue, lymph nodes, and skin [2]. Lung metastases were also considered to be infrequent; however, in our series, we found that 15% of the patients developed lung metastases. This is consistent with the previous data that both lung and bone metastases are somewhat late events seen in advanced disease [24]. Patients with bone metastasis also have a poorer prognosis than patients with metastasis in any other site [2, 3]. In the largest GIST series (Table 3), the reported rate of bone metastasis is quite low, and bone metastases seem to occur more often in rectal GISTs compared to small-intestinal and gastric GISTs, both of which have a comparable frequency [25–28].

The incidence of metastatic GIST seems to be underestimated compared with that of other sarcomas [2–4, 29, 30]. This may be because radiological bone survey is not routinely performed in GIST patients, unless there are significant clinical indications such as fracture and severe pain. Not unexpectedly, GIST metastasis to bone may become more

prevalent due to extensive use of imaging techniques and increased patient life expectancy resulting from the improvement in therapeutic modalities. In line with this, current recommendations for radiographical management of high- and intermediate-risk GIST propose a CT scan every 3–4 months for 3 years [31]. While bone lesions in a patient with a history of GIST raise the suspicion of metastatic disease, the imaging features are not pathognomonic; hence, confirmation of the diagnosis requires histopathological examination and specific immunohistochemical or molecular techniques [15, 16]. A recently described entity, imatinib-related bone marrow necrosis, may also mimic bone metastasis [32, 33]. Therefore, radiological diagnosis of metastasis for a solitary lytic bone lesion should be supported with histopathological examination, especially in patients on tyrosine kinase inhibitor drug therapy.

Regarding the distribution of primary tumor location of our series, several findings are of particular interest. Small intestinal GISTs (29%) and rectal GISTs constituted the majority of cases. Higher prevalence of bone metastasis in intestinal GISTs is not surprising, as intestinal GISTs are

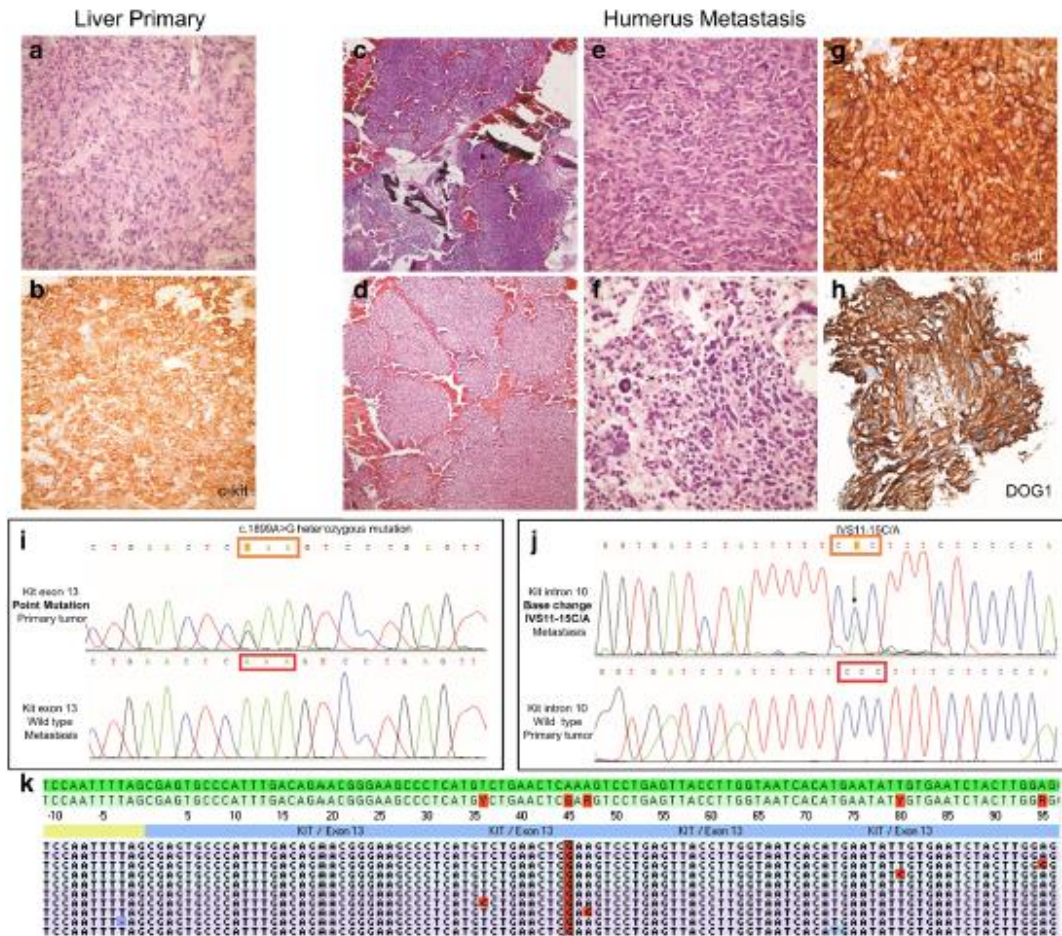


Fig. 2 **a** Bland spindle cells forming short fascicles within a collagenous stroma in case no. 2 (H&E, $\times 400$). **b** Neoplastic cells were diffusely positive with CD117 ($\times 400$). **c, d** Biopsy from the humerus was composed of cellular islands in a hemorrhagic background ($\times 100$ and $\times 200$). **e** Spindle cells intermingled with collagen resembled the primary ($\times 400$). **f** Focal epithelioid morphology with bizarre neoplastic giant cells was encountered ($\times 400$). Tumor cells expressed CD117 (**g**) and DOG1 (**h**) ($\times 400$). **i** Gene sequence of KIT exon 13 showed that liver primary had a single nucleotide mutation. **j** An intronic base change (IVS11-15C>A) was present on KIT gene at the metastatic site. **k** Next-generation sequencing of metastatic tumor validated the presence of the same KIT exon 13 mutation that was seen in the primary tumor

more aggressive than gastric GISTs. Similarly, the high number of rectal GISTs in our series (21%) indicates that GISTs of rectal origin are more aggressive. EGISTs have similar morphologic, immunophenotypic, and molecular features as conventional GISTs, including a high frequency of *KIT* or *PDGFRA* mutations and overexpression of CD117 by immunohistochemistry [25, 34, 35]. EGISTs are reported to behave more aggressively than omental GISTs, more akin to small intestinal than gastric GISTs [34, 36, 37]. Both EGISTs in our series, one of which also invaded the small intestinal mesentery, arose in an ovary. EGISTs are known to occur in the female reproductive

system [38–41], but due to the low number of cases, data on prognosis are inadequate to draw any conclusions. Liver tends to be mainly involved in the metastatic process rather than being a primary site for GIST. However, we were not able to demonstrate an intra-abdominal primary site in one of our cases with a large solitary hepatic GIST (case no. 2) with *KIT* Exon 13 mutation, suggesting that it was a primary liver GIST. Primary liver GISTs are quite rare with only a few cases reported in the literature [42–46]. Even so, we grouped this case as unknown primary rather than primary liver EGIST, because a consensus on the liver as the primary site had not been reached.

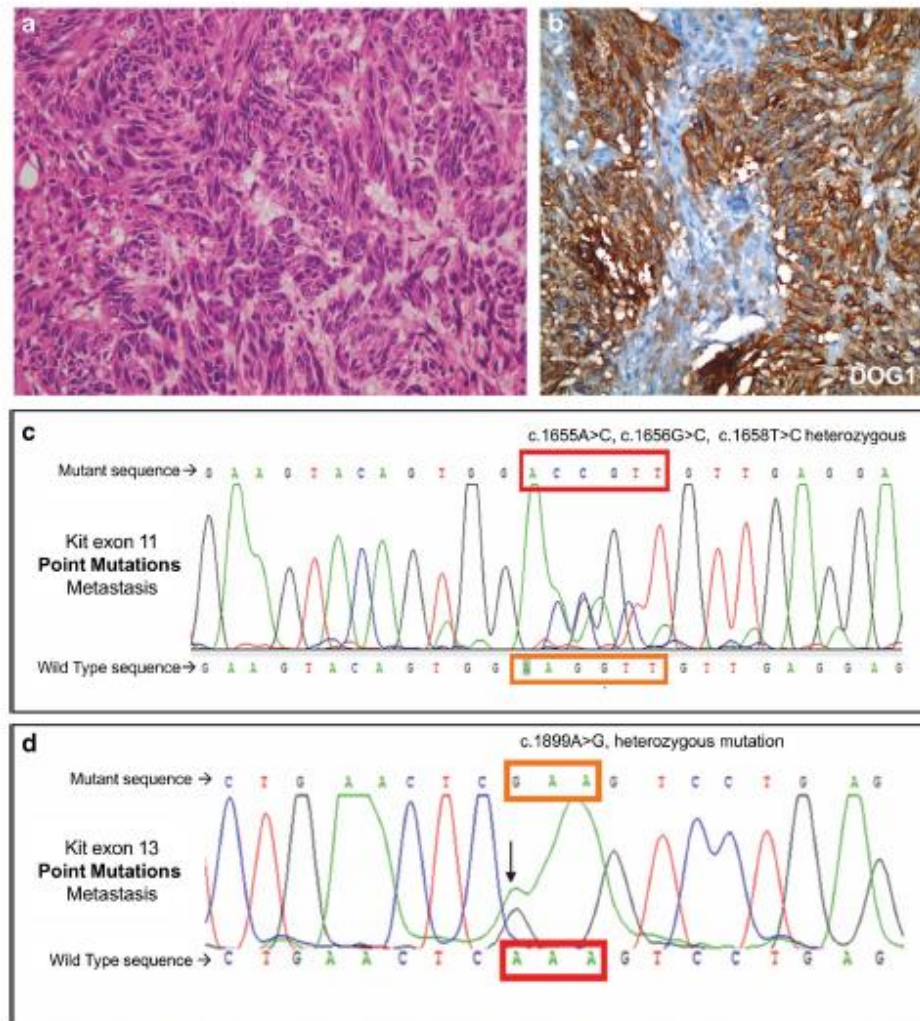


Fig. 3 **a** Typical morphological features of GIST were seen in the scapular metastasis (case no. 4, $\times 200$). **b** Diffuse DOG1 positivity ($\times 200$). Electropherogram images of direct sequencing results of KIT Exon 11 (**c**) and Exon 13 (**d**) mutations in metastatic focus

Histopathologically, we noted myxoid degeneration, hypervascular background, and hyaline change in several cases. In one case (case no. 2), we observed pronounced atypia associated with neoplastic multinuclear giant cells in a metastatic focus, which were not present in the primary. These morphological changes may represent either sarcomatoid transformation, quite a rare phenomenon [47], or degenerative alterations related to imatinib therapy, as a prominent increase in mitotic figures or necrosis was not noted. Degenerative changes due to imatinib therapy were also noted by Hu et al. [43]. Also, some of these alterations have been ascribed to imatinib therapy, associated with regression due to partial

response to therapy in combination with therapy resistance of subpopulations of tumor cells [48]. Regressive changes include hypocellular, myxoid, and/or fibrotic stroma associated with few residual neoplastic cells representing GIST with pyknotic nuclei and minimal cytoplasm, stromal deposition of eosinophilic material, and reduction in CD117 expression. Resistant GISTs show more epithelioid cells with abundant cytoplasm, although there is some debate about this phenotypical correlate [48].

Differential diagnosis of metastatic GIST in a bone biopsy is lengthy, due to its histological variants and its rarity. Tumors included in the differential diagnosis depend on the main

Table 2 Molecular characteristics of presented cases

	Mutation in primary	Mutation in metastasis
Case 1	None ^a	KIT exon 11 Del/ins at codons 555,556,565,568 heterozygous
Case 2	KIT exon 13 K642E heterozygous	KIT exon 13 K642E heterozygous ^b Base changes in Intron 10 (IVS11-15C/A)
Case 3	Exon 11 V599D homozygous	KIT exon 11 (c.1744_1749 delGTGGAAinsCAC) heterozygous
Case 4	N/A	KIT exon 11K557T and V558T heterozygous KIT exon 11W582* ^b KIT exon 13 K642E heterozygous
Case 5	N/A	KIT exon 11 del(W556_K557) homozygous
Case 6	N/A	WT

N/A not available

^aNo mutations detected by Sanger sequencing, NGS could not be performed due to lack of available material

^bDetected by using next-generation sequencing (NGS)

histological pattern of GIST: fascicular (spindle cell), epithelioid, and pleomorphic. Radiological evaluation together with clinical setting and morphological demonstration of cartilaginous or osteoid areas excludes primary bone tumors, such as osteosarcoma and chondrosarcoma. An immunohistochemical marker panel should include cytokeratins for metastatic carcinoma, S100 protein for malignant nerve sheath tumor, and melanoma, desmin, and SMA for leiomyosarcoma. Considering that expression of CD34 and CD117 is not pathognomonic for GIST [49] and may become negative in metastatic foci [19], the use of DOG1 (diagnosed on GIST-1), a surrogate marker for GIST, is highly recommended [50]. Diagnosis of metastatic GIST in a bone biopsy in the absence of clinical data is even more challenging, given its rarity.

The most frequent gene mutations in GISTs are those in exons 9, 11, 13, and 17 of the *KIT* gene. However, most are non-specific and complex-type mutations. The frequency of GISTs with primary *KIT* exon 13 or exon 17 mutations is not higher than 1 to 2% [8]. The most frequent *KIT* exon 13 mutant is K642E, although other mutations in the vicinity of codon 642 have also been documented. In our series, only two tumors showed a *KIT* mutation leading to a single amino acid substitution (K642E) in exon 13. In the metastasis of case no. 2, a base change in intron 10 (IVS11-15C/A) was found in addition to an exon 13 mutation. Base changes in the intron 10–exon 11 boundary of *KIT* have been described as a very rare finding in previous case reports [51, 52]. In case no. 3, the codon 599 mutation in the primary tumor could not be

detected in the metastatic sample as it showed complex mutations with deletion and insertion in the same area. In case no. 4, a patient on imatinib therapy with a metastatic lesion at the scapula might have evolved into a double mutant with a *KIT* exon 13 and two different *KIT* Exon 11 mutations, one of which was a non-sense mutation. This patient responded to sunitinib therapy and is doing well for 2 years. Double mutants are reported to respond better to sunitinib than to imatinib [53]. In our series, the most frequent molecular alteration was *KIT* exon 11 (7/9 cases, 78%). Mutation data from the three cases in the literature are based on the primary tumors. Two of our four cases had deletions/insertions, one had a deletion, and one showed a single-nucleotide mutation. In addition to deletions, the rare insertions affecting codons 557–559 might also be associated with poor prognosis and metastatic behavior, as suggested by previous publications [54–60]. One experimental study suggests that deletions in these codons are related to GIST metastatic behavior [61]. Our three cases (cases no. 1, no. 3, and no. 5) with a deletion/insertion type of complex mutation in exon 11 were characterized by a relatively better course of disease (alive with disease over 5 years) in spite of bone metastasis. In some series, most of the GISTs showed the same mutation in the primary and recurrent/metastatic tumors [62]. Others demonstrated major differences between the mutation profile of primary and recurrent/metastatic tumors, explained by clonal evolution or therapy resistance [63, 64]. In two of three cases in our series, the mutation found in the primary was conserved

Table 3 Bone metastasis and mortality rates of four largest GIST series

	Number	Bone metastasis	Disease-specific mortality
Gastric GISTs (Miettinen et al. 2005)	1765	4/1074 (0.4%)	17%
Small intestinal GISTs (Miettinen et al. 2006)	906	4/627 (0.6%)	39%
Omental GISTs (Miettinen et al. 2009)	95	Not available	39%
Rectal GISTs (Miettinen et al. 2001)	133	3/111 (3%)	40%

in the metastasis. However, additional studies including next-generation sequencing or double PCR elucidate these conserved mutations. A major issue in detecting mutations in bone metastases is poor quality of the DNA, due to decalcification procedures. Next-generation sequencing methods using targeted panels might be more appropriate to screen for mutations in these tumors and their metastases [65].

In conclusion, most bone metastases from GISTs occur in advanced disease with multiple metastases. They are solitary or multiple lytic masses, particularly in the axial skeleton, occasionally invading surrounding soft tissue. Rectal and intestinal GISTs are more likely to show bone metastases. The histological appearance is diverse, which leads to a large differential diagnosis. Although deletions in Exon 11 codon 557–559 have been associated with metastasis, the low number of cases with these mutations precludes confirmation of an association between this specific molecular alteration and bone metastasis.

Acknowledgements The molecular studies and DOG1 staining were performed in Ankara University, Department of Pathology, and supported by an institutional contribution of TUBITAK (project no.: 209S109).

This study presented as poster at the USCAP Meeting, Baltimore, USA, 2013.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Weiss SW, Goldblum JR, Enzinger FM (2008) *Enzinger and Weiss' soft tissue tumors*, 5th edn. Mosby Elsevier, Philadelphia
- Bertoldi R, Furnagalli E, Coco P, Messina A, Morosi C, Dileo P, Casali PG (2009) Unusual metastatic sites in gastrointestinal stromal tumor (GIST). *J Clin Oncol* 27:15s (suppl; abstr 10566)
- Schuler M, Zeile M, Pink D, Turn P, Kretschmar A, Rau B, P. R (2008) Incidence of bone metastases in GIST: a single center analysis of 307 patients with metastatic disease. *J Clin Oncol* 26:15s (suppl; abstr 10565)
- Burkill GJ, Badran M, Al-Muderis O, Meirion Thomas J, Judson IR, Fisher C, Moskovic EC (2003) Malignant gastrointestinal stromal tumor: distribution, imaging features, and pattern of metastatic spread. *Radiology* 226(2):527–532
- Stamatikos M, Douzinas E, Stefanaki C, Safioleas P, Polyzou E, Levidou G, Safioleas M (2009) Gastrointestinal stromal tumor. *World J Surg Oncol* 7:61. doi:10.1186/1477-7819-7-61
- Corless CL (2014) Gastrointestinal stromal tumors: what do we know now? *Mod Pathol* 27(Suppl 1):S1–16. doi:10.1038/modpathol.2013.173
- Maleklu A, Pantaleo MA, Nannini M, Biasco G (2011) The role of mutational analysis of KIT and PDGFRA in gastrointestinal stromal tumors in a clinical setting. *J Transl Med* 9:75. doi:10.1186/1479-5876-9-75
- Lasota J, Corless CL, Heinrich MC, Debiec-Rychter M, Sciot R, Wardelmann E, Merkelbach-Bruse S, Schildhaus HU, Steigen SE, Stachura J, Wozniak A, Antonescu C, Daum O, Martin J, Del Muro JG, Miettinen M (2008) Clinicopathologic profile of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) with primary KIT exon 13 or exon 17 mutations: a multicenter study on 54 cases. *Mod Pathol* 21(4):476–484. doi:10.1038/modpathol.2008.2
- Lasota J, Miettinen M (2008) Clinical significance of oncogenic KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology* 53(3):245–266. doi:10.1111/j.1365-2559.2008.02977.x
- Slimack NP, Liu JC, Koski T, McClendon J Jr, O'Shaughnessy BA (2012) Metastatic gastrointestinal stromal tumor to the thoracic and lumbar spine: first reported case and surgical treatment. *Spine J* 12(1):e7–12. doi:10.1016/j.spinee.2011.10.037
- Pollicarpo-Nicolas ML, Lal A, Nicolas MM, De Frias DV, Nayar R, Nemcek AL Jr, Mellott AL (2006) Bone metastasis of a gastrointestinal tumor with diagnosis by fine needle aspiration biopsy. *Acta Cytol* 50(3):354–357
- Ozan E, Oztekin O, Alacacioglu A, Aylas A, Postaci H, Adibelli Z Esophageal gastrointestinal stromal tumor with pulmonary and bone metastases. *Diagn Interv Radiol* 16(3):217–220. doi:10.4261/1305-3825.DIR.1861-08.2
- Jati A, Tatli S, Morgan JA, Glickman JN, Demetri GD, Van den Abbele A, Silverman SG (2012) Imaging features of bone metastases in patients with gastrointestinal stromal tumors. *Diagn Interv Radiol*. doi:10.4261/1305-3825.dir.5179-11.1
- Gil-Arnaiz I, Martinez-Trufero J, Pazo-Cid RA, Felipe F, Lecumberri MJ, Calderero V (2009) Skull metastasis from rectal gastrointestinal stromal tumours. *Clin Transl Oncol* 11(9):625–627
- Di Scioscio V, Greco L, Pallotti MC, Pantaleo MA, Maladdu A, Nannini M, Bazzocchi A, Di Battista M, Mandrioli A, Lolli C, Saponara M, Giorgio G, Biasco G, Zompatori M (2011) Three cases of bone metastases in patients with gastrointestinal stromal tumors. *Rare Tumors* 3(2):e17. doi:10.4081/rt.2011.e17
- Chu TYC, Wong CS (2009) Bone metastases from gastrointestinal stromal tumour: correlation with positron emission tomography-computed tomography. *J HK Coll Radiol* 11:172–175
- Chou SQH, Tse KS, Wong WK, Chan SCH (2010) Vulval gastrointestinal stromal tumours with bone metastases. *J Hong Kong Col Radiol* 13:88–90
- Bajaj A, Simpson I, Longano A, Roy S, Richardson G (2009) Bone marrow metastasis in gastro-intestinal stromal tumour. *Br J Haematol* 147(1):2. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07735.x
- Abuzakham SM, Acre-Lara CE, Zhao W, Hitchcock C, Mohamed N, Arbogast D, Shah MH (2011) Unusual metastases of gastrointestinal stromal tumor and genotypic correlates: case report and review of the literature. *J Gastrointest Oncol* 2:45–49
- Baeg MK, Bae SH, Lee KH, Kim J, Park IS, Jin JY Diplopia as a presenting symptom in a gastric gastrointestinal stromal tumor. *Jpn J Clin Oncol* 41(2):265–268. doi:10.1093/jcco/hyq176
- Jain A, Dubashi B, Chandan SS, Halanaka D (2011) Mesenteric gastrointestinal stromal tumor with bone metastases. *Indian J Cancer* 48(3):383–384. doi:10.4103/0019-509X.84934
- Tezcan Y, Koc M (2011) Gastrointestinal stromal tumor of the rectum with bone and liver metastasis: a case study. *Med Oncol* 28(Suppl 1):S204–S206. doi:10.1007/s12032-010-9697-7
- Selekdircik F, Tursi D, Ozturk MA, Dervisoglu D, Sager S, Hiz M, Mandel NM (2012) Gastrointestinal stromal tumor of the rectum with scapular metastasis: a case report. *J Med Case Rep* 6(145). doi:10.1186/1752-1947-6-145
- Steigen SE, Eide TJ (2009) Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): a review. *APMIS* 117(2):73–86. doi:10.1111/j.1600-0463.2008.00020.x
- Miettinen M, Sobin LH, Lasota J (2009) Gastrointestinal stromal tumors presenting as omental masses—a clinicopathologic analysis of 95 cases. *Am J Surg Pathol* 33(9):1267–1275. doi:10.1097/PAS.0b013e3181a13e99

26. Miettinen M, Makhoul H, Sobin LH, Lasota J (2006) Gastrointestinal stromal tumors of the jejunum and ileum: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 906 cases before imatinib with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol* 30(4):477–489
27. Miettinen M, Sobin LH, Lasota J (2005) Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol* 29(1):52–68
28. Miettinen M, Furlong M, Sarlomo-Rikala M, Burke A, Sobin LH, Lasota J (2001) Gastrointestinal stromal tumors, intramural leiomyomas, and leiomyosarcomas in the rectum and anus: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 144 cases. *Am J Surg Pathol* 25(9):1121–1133
29. DeMatteo RP, Lewis JJ, Leung D, Mudan SS, Woodruff JM, Brennan MF (2000) Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival. *Ann Surg* 231(1):51–58
30. Yoshikawa H, Myoui A, Ochi T, Anaki N, Ueda T, Kudawara I, Nakanishi K, Tanaka H, Nakamura H (1999) Bone metastases from soft tissue sarcomas. *Semin Musculoskelet Radiol* 3(2):183–190. doi:10.1055/s-2008-1080061
31. Blay JY, Bonvalot S, Casali P, Choi H, Debiec-Richter M, Dei Tos AP, Emile JF, Gronchi A, Hogendoorn PC, Joensuu H, Le Cesne A, McClure J, Maurel J, Nupponen N, Ray-Coquard I, Reichardt P, Sciot R, Stroobants S, van Glabbeke M, van Oosterom A, Demetri GD (2005) Panelists Gcm: consensus meeting for the management of gastrointestinal stromal tumors. Report of the GIST Consensus Conference of 20–21 March 2004, under the auspices of ESMO. *Ann Oncol* 16(4):566–578. doi:10.1093/annonc/mdl127
32. Aras Y, Akcakaya MO, Unal SN, Bilgic B, Unal OF (2012) Bone marrow necrosis secondary to imatinib usage, mimicking spinal metastasis on magnetic resonance imaging and FDG-PET/CT. *J Neurosurg Spine* 16(1):57–60. doi:10.3171/2011.9.SPINE.1401
33. Vanel D, Bonvalot S, Pechoux CL, Clouff A, Domont J, Cesne AL (2007) Imatinib-induced bone marrow necrosis detected on MRI examination and mimicking bone metastases. *Skelet Radiol* 36(9):895–898. doi:10.1007/s00256-007-0344-0
34. Reith JD, Goldblum JR, Lyles RH, Weiss SW (2000) Extragastric (soft tissue) stromal tumors: an analysis of 48 cases with emphasis on histologic predictors of outcome. *Mod Pathol* 13(5):577–585. doi:10.1038/modpathol.3880099
35. Yamamoto H, Oda Y, Kawaguchi K, Nakamura N, Takahira T, Tamiya S, Saito T, Oshiro Y, Ohta M, Yao T, Tsuneyoshi M (2004) c-kit and PDGFRA mutations in extragastric stromal tumor (gastrointestinal stromal tumor of the soft tissue). *Am J Surg Pathol* 28(4):479–488
36. Barros A, Lirihares E, Valadao M, Goncalves R, Vilhena B, Gil C, Ramos C (2011) Extragastric stromal tumors (EGIST): a series of case reports. *Hepato-Gastroenterology* 58(107–108):865–868
37. Miettinen M, Lasota J (2011) Histopathology of gastrointestinal stromal tumor. *J Surg Oncol* 104(8):865–873. doi:10.1002/jso.21945
38. Molina I, Seamon LG, Copeland LJ, Suarez A (2009) Reclassification of leiomyosarcoma as an extra-gastrointestinal stromal tumor of the gynecologic tract. *Int J Gynecol Pathol* 28(5):458–463. doi:10.1097/PGP.0b013e31819c7fc1
39. Foster R, Solano S, Mahoney J, Fuller A, Oliva E, Seiden MV (2006) Reclassification of a tubal leiomyosarcoma as an eGIST by molecular evaluation of c-KIT. *Gynecol Oncol* 101(2):363–366. doi:10.1016/j.ygyno.2005.12.022
40. Wepler EH, Gaertner EM (2005) Malignant extragastric stromal tumor presenting as a vaginal mass: report of an unusual case with literature review. *Int J Gynecol Cancer* 15(6):1169–1172. doi:10.1111/j.1525-1438.2005.00269.x
41. Lam MM, Corless CL, Goldblum JR, Heinrich MC, Downs-Kelly E, Rubin BP (2006) Extragastric stromal tumors presenting as vulvovaginal/rectovaginal septal masses: a diagnostic pitfall. *Int J Gynecol Pathol* 25(3):288–292. doi:10.1097/01.pgp.0000215291.22867.18
42. De Chiara A, De Rosa V, Lastoria S, Franco R, Botti G, Iaffaioli VR, Apice G (2006) Primary gastrointestinal stromal tumor of the liver with lung metastases successfully treated with STI-571 (imatinib mesylate). *Front Biosci* 11:498–501
43. Hu X, Foster J, Darnjanov I (2003) Primary malignant gastrointestinal stromal tumor of the liver. *Arch Pathol Lab Med* 127(12):1606–1608. doi:10.1043/1543-2165(2003)127<1606:PMGSTO>2.0.CO;2
44. Luo XL, Liu D, Yang JJ, Zheng MW, Zhang J, Zhou XD (2009) Primary gastrointestinal stromal tumor of the liver: a case report. *World J Gastroenterol* 15(29):3704–3707
45. Ochiai T, Sonoyma T, Kikuchi S, Ikoma H, Kubota T, Nakanishi M, Ichikawa D, Kikuchi S, Fujiwara H, Okamoto K, Sakakura C, Kokuba Y, Taniguchi H, Otsuji E (2009) Primary large gastrointestinal stromal tumor of the liver: report of a case. *Surg Today* 39(7):633–636. doi:10.1007/s00595-008-3885-5
46. Yamamoto H, Miyamoto Y, Nishihara Y, Kojima A, Imamura M, Kishikawa K, Takase Y, Ario K, Oda Y, Tsuneyoshi M (2010) Primary gastrointestinal stromal tumor of the liver with PDGFRA gene mutation. *Hum Pathol* 41(4):605–609. doi:10.1016/j.humpath.2009.09.016
47. Merten L, Agaimy A, Moskalev EA, Giedl J, Kayser C, Gedder H, Schaefer IM, Cameron S, Werner M, Strobel P, Hartmann A, Haller F (2016) Inactivating mutations of RB1 and TP53 correlate with sarcomatous histomorphology and metastasis/recurrence in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Clin Pathol* 146(6):718–726. doi:10.1093/ajcp/aww193
48. Wong NA (2011) Gastrointestinal stromal tumours—an update for histopathologists. *Histopathology* 59(5):807–821. doi:10.1111/j.1365-2559.2011.03812.x
49. Miettinen M, Lasota J (2005) KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 13(3):205–220
50. Miettinen M, Wang ZF, Lasota J (2009) DOG1 antibody in the differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a study of 1840 cases. *Am J Surg Pathol* 33(9):1401–1408. doi:10.1097/PAS.0b013e318181a90e1a
51. Corless CL, McGravey L, Town A, Schroeder A, Bainbridge T, Harrell P, Fletcher JA, Heinrich MC (2004) KIT gene deletions at the intron 10-exon 11 boundary in GI stromal tumors. *J Mol Diagn* 6(4):366–370. doi:10.1016/S1525-1578(10)60533-8
52. Lee JR, Joshi V, Griffin JW Jr, Lasota J, Miettinen M (2001) Gastrointestinal autonomic nerve tumor: immunohistochemical and molecular identity with gastrointestinal stromal tumor. *Am J Surg Pathol* 25(8):979–987
53. Heinrich MC, Maki RG, Corless CL, Antonescu CR, Harlow A, Griffith D, Town A, McKinley A, Ou WB, Fletcher JA, Fletcher CD, Huang X, Cohen DP, Baum CM, Demetri GD (2008) Primary and secondary kinase genotypes correlate with the biological and clinical activity of sunitinib in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 26(33):5352–5359. doi:10.1200/JCO.2007.15.7461
54. Martín J, Poveda A, Llombart-Bosch A, Ramos R, Lopez-Guerrero JA, Garcia del Muro J, Maurel J, Calabuig S, Gutierrez A, Gonzalez de Sando JL, Martínez J, De Juan A, Lainez N, Lasa F, Aljiza V, Escudero P, Casado A, Garcia P, Blanco R, Buesa JM (2005) Spanish Group for Sarcoma R: deletions affecting codons 557–558 of the c-KIT gene indicate a poor prognosis in patients with completely resected gastrointestinal stromal tumors: a study by the

- Spanish Group for Sarcoma Research (GEIS). *J Clin Oncol* 23(25): 6190–6198. doi:10.1200/JCO.2005.19.554
55. Ma Y, Cunningham ME, Wang X, Ghosh I, Regan L, Longley BJ (1999) Inhibition of spontaneous receptor phosphorylation by residues in a putative alpha-helix in the KIT intracellular juxtamembrane region. *J Biol Chem* 274(19):13399–13402
 56. Antonescu CR, Sommer G, Sarran L, Tschernyavsky SJ, Riedel E, Woodruff JM, Robson M, Maki R, Brennan MF, Ladanyi M, DeMatteo RP, Besmer P (2003) Association of KIT exon 9 mutations with nongastric primary site and aggressive behavior: KIT mutation analysis and clinical correlates of 120 gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 9(9):3329–3337
 57. Kontogianni-Katsarou K, Dimitriadis E, Lariou C, Kairi-Vassilatou E, Pandis N, Kondi-Paphiti A (2008) KIT exon 11 codon 557/558 deletion/insertion mutations define a subset of gastrointestinal stromal tumors with malignant potential. *World J Gastroenterol* 14(12): 1891–1897
 58. Joensuu H, Rutkowski P, Nishida T, Steigen SE, Brabc P, Plank L, Nilsson B, Bracconi C, Bordoni A, Magnusson MK, Sufiarsky J, Federico M, Jonasson JG, Hostein I, Bringuer PP, Emile JF (2015) KIT and PDGFRA mutations and the risk of GI stromal tumor recurrence. *J Clin Oncol* 33(6):634–642. doi:10.1200/JCO.2014. 57.4970
 59. Patrikidou A, Domont J, Chahaud S, Ray-Coquard I, Coindre JM, Bui-Nguyen B, Adenis A, Rios M, Bertucci F, Duffaud F, Chevreau C, Cupissol D, Perol D, Emile JF, Blay JY, Le Cesne A, French Sarcoma G (2016) Long-term outcome of molecular subgroups of GIST patients treated with standard-dose imatinib in the BFR14 trial of the French Sarcoma Group. *Eur J Cancer* 52:173–180. doi: 10.1016/j.ejca.2015.10.069
 60. Kumari N, Priyaa V, Shukla P, Kumar A, Aggarwal R, Krishnani N (2016) Gastrointestinal stromal tumor: genotype frequency and prognostic relevance. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. doi: 10.1097/PAL0000000000000395
 61. Wang HC, Li TY, Chao YJ, Hou YC, Hsueh YS, Hsu KH, Shan YS (2016) KIT exon 11 codons 557-558 deletion mutation promotes liver metastasis through the CXCL12/CXCR4 axis in gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 22(14):3477–3487. doi:10. 1158/1078-0432.CCR-15-2748
 62. Rossle M, Hirschmann A, Diebold J (2011) Mutational spectrum and therapy response of metastasized GIST in Central Switzerland—a population-based study. *Eur J Cancer* 47(9):1305– 1311. doi:10.1016/j.ejca.2011.01.012
 63. Antonescu CR, Besmer P, Guo T, Arkun K, Horn G, Koryotowski B, Leversha MA, Jeffrey PD, Desantis D, Singer S, Brennan MF, Maki RG, DeMatteo RP (2005) Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. *Clin Cancer Res* 11(11):4182–4190. doi:10.1158/1078- 0432.CCR-04-2245
 64. Wardelmann E, Merkelbach-Bruse S, Pauls K, Thomas N, Schildhaus HU, Heinicke T, Speidel N, Pietsch T, Buettner R, Pink D, Reichardt P, Hohenberger P (2006) Polyclonal evolution of multiple secondary KIT mutations in gastrointestinal stromal tumors under treatment with imatinib mesylate. *Clin Cancer Res* 12(6):1743–1749. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1211
 65. Saponara M, Urbini M, Astolfi A, Indio V, Ercolani G, Del Gaudio M, Santini D, Pirini MG, Fiorentino M, Nannini M, Lollì C, Mandrioli A, Gatto L, Brandi G, Biasco G, Pirna AD, Pantaleo MA (2015) Molecular characterization of metastatic exon 11 mutant gastrointestinal stromal tumors (GIST) beyond KIT/PDGFRalpha genotype evaluated by next generation sequencing (NGS). *Oncotarget* 6(39):42243–42257. doi:10.18632/oncotarget. 6278