



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DİFFÜZ BÜYÜK B-HÜCRELİ LENFOMADA
EKSOZOMAL VE NÜKLEER DNA METİLASYON
PATERNLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

İkbal Cansu BARIŞ

Aralık 2018
DENİZLİ

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DİFFÜZ BÜYÜK B-HÜCRELİ LENFOMADA EKSOZOMAL VE
NÜKLEER DNA METİLYASYON PATERNLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

İkbal Cansu BARIŞ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gülseren BAĞCI

Denizli, 2018

DOKTORA TEZİ ONAY FORMU

İkbal Cansu Barış tarafından Prof. Dr. Gülseren BAĞCI yönetiminde hazırlanan " **DİFFÜZ BÜYÜK B-HÜCRELİ LENFOMADA EKSOZOMAL VE NÜKLEER DNA METİLYASYON PATERNLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**" başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Uğur ÖZBEK
Acıbadem Üniversitesi



Danışman: Prof. Dr. Gülseren BAĞCI
Pamukkale Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ
Pamukkale Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU
Akdeniz Üniversitesi



Üye: Doç. Dr. Selda ŞİMŞEK
Pamukkale Üniversitesi

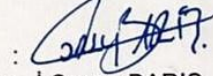


Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
09/01/2019 tarih ve 01/14.. sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Hakan AKÇA
Müdür

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

İmza

: 

Öğrenci Adı Soyadı : İ.Cansu BARIŞ

ÖZET

DİFFÜZ BÜYÜK B-HÜCRELİ LENFOMADA EKSOZOMAL VE NÜKLEER DNA METİLYASYON PATERNLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Bariş İkbal Cansu
Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Gülseren BAĞCI

Aralık 2018, 99 sayfa

Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma (DBBHL) agresif lenfomaların en yaygın tipidir ve Hodgkin-dışı lenfomaların yaklaşık %30-40'ını oluşturmaktadır. DBBHL'nin moleküler patogenezi kompleks ve çok basamaklı mekanizmaları içermektedir. Bu mekanizmalardan bir bölümü aydınlatılmış olsa da, henüz hastalığın tam olarak patogenezi bilinmemektedir.

Kanser hücrelerinden köken alan eksozomların tümör oluşumu, progresyonu ve yayılımına neden olacak önemli modülatörleri içerdikleri iyi bilinmektedir. Bu çerçevede, bu çalışma DBBHL'de primer tümörde *EZH2*-hedef genlerinde gözlenen epigenetik değişimlerin sirkülasyondaki eksozomlarda da belirlenebilirliğini değerlendirmek amacı ile dizayn edildi.

Çalışmada 21 DBBHL hastası ve 21 sağlıklı gönüllü bireyin plazma eksozomları izole edildi. Eksozomlardan ve primer tümör dokularından DNA izolasyonu yapılarak, metilasyon-spesifik PCR ile hedef genlerdeki metilasyon durumları belirlendi. Aynı zamanda izole edilen RNA örnekleri kullanılarak, eksozomların ve primer tümör doku örneklerinin hedef genlere ait transkriptleri içerip içermedikleri belirlendi. *EZH2*'de mutasyonun varlığı DNA dizi analizi ile incelendi.

Primer tümörlerle uyumlu olarak DBBHL eksozom örneklerinin *CDKN1A* ve *CDKN1B* unmetile DNA'sını ve *CDKN2A* ve *CDKN2B* metile DNA'sını içerdikleri belirlendi. DBBHL FFPE doku örneklerinin tümünde *EZH2* mRNA'sının varlığı gözlenmişken karşılıkları olan eksozom örneklerinde söz konusu transkriptin varlığına rastlanmadı. FFPE doku örneklerinin 12'sinde (%57) *CDKN1A*; 9'unda (%43) *CDKN2A* mRNA'sının varlığı belirlenirken, aynı örneklerin eksozom karşılıklarında *CDKN1A* ve *CDKN2A* mRNA'larına rastlanmadı. FFPE doku örneklerinin tümünde *CDKN1B*; 3'ünde (%14) *CDKN2B* transkriptinin varlığı belirlenmişken karşılıkları olan eksozom örneklerinin %38'inin *CDKN1B* transkriptini içerdikleri ve hiçbirinin *CDKN2B* transkripti içermediği belirlendi. Ayrıca, primer tümörle uyumlu olarak eksozom örneklerinin *EZH2* Y641 mutasyonunu taşımadığı saptandı.

Bu çalışma, DBBHL-kökenli eksozomlarda DNA'nın varlığını gösteren ilk çalışmadır. Bu çalışma DBBHL'de plazma eksozomlarının primer tümörle uyumlu DNA fragmanlarını içerdiklerini gösteren ilk çalışmadır. DBBHL'de plazma eksozomlarının primer tümörden tercihli olarak özgün hedef moleküllerini paketlediklerini ve *CDKN1B* ile *CDKN2A* ve *CDKN2B*'nin rol oynadığı yollar üzerinden lenfomageneze katıldıklarını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma, eksozom, epigenetik, *EZH2*, *EZH2*-hedef genleri

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2016SABE005).

ABSTRACT

COMPARISON OF EXOSOMAL AND NUCLEAR DNA METHYLATION PATTERNS IN DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA

Bariş İkbâl Cansu
PhD Thesis, Department of Medical Biology
Supervisor: Prof. Dr. Gülseren BAĞCI

December 2018, 99 pages

Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) is the most common type of aggressive lymphoma, and accounts for approximately 30-40% of non-Hodgkin's lymphomas. The molecular pathogenesis of DLBCL is a complex, multistep process. Although recent advances in our understanding of the process have been significant, the pathogenesis still remains to be elucidated.

It is well known that exosomes derived from cancer cells are able to transfer important modulators for tumor formation, progression and spread. In this respect, this study was designed to evaluate if epigenetic changes in *EZH2*-targeted genes in primary tumor are also observed in circulating exosomes.

This study included 21 healthy volunteers and 21 DLBCL patients and then plasma exosomes were isolated. After DNA isolation from the exosomes and primary tumor tissue samples, methylation-specific PCR was used to determine methylation status of the target genes. It was also determined whether exosomes and primary tumor tissue samples contained transcripts of the target genes using isolated RNA samples. DNA sequencing was used to determine the presence of mutation in *EZH2*.

In concordance with the primary tumors, *CDKN1A* and *CDKN1B* unmethylated DNAs and *CDKN2A* and *CDKN2B* methylated DNAs were determined in the exosomes isolated from DLBCL patients. *EZH2* transcript was found in all primary tumor samples of DLBCL patients but no in the exosome counterpart. *CDKN1A* and *CDKN2A* transcripts were determined in 12 (57%) and 9 (43%) of the FFPE tumor samples, respectively whereas these transcripts were not found in the exosomes. *CDKN1B* transcript was determined in all FFPE tumor samples while *CDKN2B* transcript was determined in 3(14%) of the tumor samples. In the exosome counterpart, the presence of *CDKN1B* transcript was observed in 38% of the samples while there was no transcript for *CDKN2B*. In addition to, *EZH2* Y641 mutation was not detected in both exosome samples and primary tumor samples counterparts.

This study is the first to show that exosomes included DNA fragments which is in concordance with primary tumors. We thought that specific target molecules were preferentially sorted into exosomes and plasma exosomes may contribute to lymphomagenesis, at least in part, by pathogenic pathways including *CDKN1B*, *CDKN2A* and *CDKN2B*.

Keywords: Diffuse Large B-Cell Lymphoma, exosome, epigenetic, *EZH2*, *EZH2*-targeted genes

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit through project number 2016SABE005.

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca ve tez çalışmam süresince bana her türlü desteği veren tez danışman hocam Prof. Dr. Gülseren BAĞCI'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında hocalarım Prof. Dr. Vildan CANER, Doç. Dr. Sevil ZENCİR, Doç. Dr.G.Ozan ÇETİN, Doç. Dr.Nilay ŐEN TÜRK, Doç.Dr. Sibel HACIOĞLU, Prof.Dr.Zeki TOPÇU'ya tüm bilimsel katkı ve destekleri ve ayrıca elektron mikroskopi görüntüleri için Doç.Dr. Nazan KESKİN'e teşekkür ederim.

Tıbbi Biyoloji Anabilimdalı başkanımız olan Prof.Dr.İbrahim Açıkbaş'a ve Tıbbi Biyoloji Anabilimdalı'ndaki tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Doktora tez projemi destekleyen Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca desteklerini her zaman hissettiğim canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa	
ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
TABLolar DİZİNİ.....	VI
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
1. GİRİŞ.....	1
1.1.Amaç	2
2. KURAMSAL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI	3
2.1. Hematopoez ve kan hücreleri	3
2.2. Lenfatik sistem ve germinal merkezler.....	3
2.3. B hücre gelişimi	5
2.3.1. V(D)J rekombinasyonu	6
2.3.2. Somatik hipermutasyon ve sınıf değişim rekombinasyonu	7
2.4. Lenfoid malignansiler	7
2.5. Olgun B hücre neoplazmları	8
2.6. Diffüz Büyük B-hücreli lenfoma.....	9
2.6.1. Epidemiyoloji.....	9
2.6.2. Risk Faktörleri.....	10
2.6.3. Patogenez	11
2.7. EZH2.....	16
2.7.1. EZH2 hedef genleri: Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri.....	18
2.8. Eksozomlar	22
2.8.1. Eksozom biyogenezi	22
2.8.2. Eksozom içeriği.....	23
2.8.3.Tümör-kökenli eksozomlar	26
2.9. Hipotezler	27
3. MATERYAL VE METOD	28
3.1.Çalışma Grubu	28
3.2. Plazma Örneklerinden Eksozom İzolasyonu.....	29
3.3.İzole Edilen Eksozomların Karakterizasyonu	29
3.3.1. Morfolojik Karakterizasyon	29
3.3.2.Eksozomal total protein konsantrasyonunun belirlenmesi	30

3.3.3. Eksozomlarda CD63, CD81 (TAPA1) ve TSG101 yüzey belirteçlerinin belirlenmesi	31
3.4. Plazma Örneklerinde Eksozom Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	32
3.5. DNA İzolasyonu	32
3.5.1. Eksozom Örneklerinden DNA izolasyonu	32
3.5.2. Eksozomal DNA'nın Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ile Görüntülenmesi	33
3.5.3. FFPE Doku Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu	33
3.6. Bisüfit Uygulaması	34
3.7. Metilasyon-Spesifik PCR (MSP)	35
3.8. Dot Blot Analizi	37
3.9. Mutasyon Analizi	38
3.10. Total RNA İzolasyonu	39
3.10.1. Eksozom Örneklerinden Total RNA izolasyonu	39
3.10.2. FFPE Doku Örneklerinden Total RNA İzolasyonu	39
3.11. Total RNA örneklerinden cDNA sentezi	40
3.12. Gerçek-zamanlı PCR	40
3.13. İstatistiksel Analiz	41
4. BULGULAR	42
4.1. DBBHL hastalarına ve kontrol grubuna ait klinikopatolojik veriler	42
4.2. Sağlıklı gönüllü bireyler ve DBBHL hastalarının plazma örneklerinden eksozom izolasyonu ve karakterizasyonu	42
4.2.1 Eksozomların morfolojik karakterizasyonu	42
4.2.2 Eksozomların total protein konsantrasyonları	45
4.2.3 Eksozomların Yüzey Belirteçleri	47
4.2.4 Sağlıklı Gönüllü Bireyler ve DBBHL Hastalarının Plazma Örneklerinde Varolan Eksozom Konsantrasyonları	47
4.2.5. Eksozomal DNA'nın varlığının gösterilmesi	50
4.2.6. FFPE doku örneklerinden izole edilen genomik DNA konsantrasyonları	50
4.3. EZH2 Hedef Genlerinin Metilasyon Paternleri	51
4.4. DOT BLOT Analiz Sonuçları	55
4.5. EZH2 Y641 Mutasyon Analiz Sonucu	56
4.6. EZH2 ve Hedef Genlerinin Ekspresyon Profilleri	56
5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇ:	74
7. KAYNAKLAR	76
8. ÖZGEÇMİŞ	87
9. EKLER	88

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil.2.1. Germinal merkezlerin hücresel ve moleküler özellikleri.....	4
Şekil.2.2. B-hücre gelişimi.....	5
Şekil.2.3. (A) V(D)J rekombinasyonu ve (B) SHM ve CSR mekanizmaları ile sekonder antikor repertuarının oluşumu	6
Şekil.2.4. Farklı olgunlaşma evrelerinde bloke edilen hücrelerden köken alan GC-kökenli lenfoma tipleri.....	9
Şekil.2.5. TC Sağlık Bakanlığı 2015 Türkiye kanser istatistik verilerine göre kadınlarda ve erkeklerde en sık görülen 10 kanser türü insidansı.....	10
Şekil.2.6. DBBHL alt tipleri ile ilgili genetik değişimler.....	11
Şekil.2.7. Normal B-Hücresi ve DBBHL'de DNA metilasyon heterojenitesi.....	15
Şekil.2.8. EZH2'nin katalitik alt ünitesi ve farklı fonksiyonları.....	17
Şekil.2.9. (A)Eksozom Biyogenez basamakları (B)Eksozom yapısı ve eksozomal içerik.....	23
Şekil.2.10. Eksozomların alıcı hücrelerle etkileşimi.....	25
Şekil.4.1. Sağlıklı gönüllü bireye ait plazma örneğinden izole edilen eksozomların (A)STEM ve (B)SEM görüntüleri.....	43
Şekil.4.2. DBBHL hastasına ait plazma örneğinden izole edilen eksozomların (A)STEM ve (B)SEM görüntüleri.....	44
Şekil.4.3. Eksozom örneklerinde total protein miktar tayini için kullanılan Bradford Standart grafiği.....	45
Şekil.4.4. Sağlıklı gönüllü bireylerin ve DBBHL hastalarının plazma örneklerinden izole edilen eksozomlardaki total protein konsantrasyonları.....	45
Şekil.4.5. (A)Sağlıklı gönüllü bireylerin ve (B)DBBHL hastalarının plazma örneklerinden izole edilen eksozomlardaki total proteinlerin Coomassie blue ile boyalı örnek SDS-PAGE jel görüntüleri.....	46
Şekil.4.6. DBBHL hastalarının eksozomal protein konsantrasyonlarının klinikopatolojik özelliklere göre dağılımı.....	46
Şekil.4.7. DBBHL hastalarına ait eksozom örneklerinde Western Blot analiz görüntüleri.....	47
Şekil.4.8. EXOCET standart grafiği.....	47
Şekil.4.9. Sağlık gönüllü bireyler ve DBBHL hastalarının plazma örneklerinden izole edilen eksozom konsantrasyonları.....	47
Şekil.4.10. DBBHL hastalarının plazma eksozom konsantrasyonlarının klinikopatolojik özelliklere göre dağılımı.....	48

Şekil.4.11. DBBHL hastalarına ait eksozom konsantrasyonları ve eksozom içerirğinde bulunan protein miktarları.....	49
Şekil.4.12. AFM ile eksozomal DNA örneğinin (A) 3-boyutlu ve (B) 2 boyutlu topografik görüntüsü.....	50
Şekil.4.13. <i>CDKN1A</i> 'ya ait metilasyon paternleri.....	52
Şekil.4.14. <i>CDKN1B</i> 'ye ait metilasyon paternleri.....	53
Şekil.4.15. <i>CDKN2A</i> 'ya ait metilasyon paternleri.....	54
Şekil.4.16. <i>CDKN2B</i> 'ye ait metilasyon paternleri.....	55
Şekil.4.17. Dot Blot Analizi görüntüleri.....	56
Şekil.4.18. DBBHL hastasına ait eksozomal DNA (A) ve genomik DNA (B) örneğinde <i>EZH2</i> Y641 mutasyon analiz sonucu.....	58
Şekil.4.19. FFPE doku (A) ve plazma eksozom (B) örneklerinde <i>EZH2</i> mRNA'sının varlığı/yokluğunu gösteren amplifikasyon eğrileri.....	58
Şekil.4.20. FFPE doku (A) ve plazma eksozom (B) örneklerinde <i>CDKN1A</i> mRNA'sının varlığı/yokluğunu gösteren amplifikasyon eğrileri.....	59
Şekil.4.21. FFPE doku (A) ve plazma eksozom (B) örneklerinde <i>CDKN2A</i> mRNA'sının varlığı/yokluğunu gösteren amplifikasyon eğrileri.....	60
Şekil.4.22. FFPE doku (A) ve plazma eksozom (B) örneklerinde <i>CDKN1B</i> mRNA'sının varlığı/yokluğunu gösteren amplifikasyon eğrileri.....	61
Şekil.4.23. FFPE doku (A) ve plazma eksozom (B) örneklerinde <i>CDKN2B</i> mRNA'sının varlığı/yokluğunu gösteren amplifikasyon eğrileri.....	62

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. Lenfoid histiosit ve dendritik neplazmaların 2016 Dünya Sağlık Örgütü Sınıflaması.....	8
Tablo 2.2. DBBHL'de en sık gözlenen mutasyonların alt gruplardaki dağılımları.....	13
Tablo 3.1. Hedef genlere özgün MSP için metile ve unmetile primer setleri.....	35
Tablo 3.2. MSP için reaksiyon karışımı.....	36
Tablo 3.3. <i>CDKN1A</i> için MSP protokolü.....	36
Tablo 3.4. <i>CDKN1B</i> için MSP protokolü.....	36
Tablo 3.5. <i>CDKN2A</i> için MSP protokolü.....	37
Tablo 3.6. <i>CDKN2B</i> için MSP protokolü.....	37
Tablo 3.7. EZH2 Y641 mutasyon analizinde kullanılan primer setleri.....	38
Tablo 3.8. cDNA sentezi için reaksiyon karışımı.....	40
Tablo 3.9. Gerçek-zamanlı PCR komponentleri.....	41
Tablo 3.10. Gerçek zamanlı PCR protokolü.....	41
Tablo 4.1. DBBHL hastalarına ait demografik veriler.....	42
Tablo 4.2. Çalışmada değerlendirilen tüm örneklerle ait C _T değerleri	63

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

DBBHL: Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma

GCB-DBBHL: Germinal Merkez Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma

Non-GCB-DBBHL: Germinal Merkez olmayan Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma

NHL: Non-Hodgkin Lenfoma

PRC2: Polcomb Repressive Complex 2

EZH2: Enhancer of Zest Homolog 2

CDK: Siklin-Bağımlı Kinaz

CDKN: Siklin-Bağımlı Kinaz İnhibitörü

RAG1: Rekombinasyonu Aktive Eden gen 1

SHM: Somatik Hipermutasyon

CSR: Sınıf-Değişim Rekombinasyonu

IGHV: İmmunoglobulin Ağır Zincir Değişken Bölgesi

FL: Foliküler Lenfoma

AID: Sitidin Deaminaz

EBV: Epstein-Barr virüsü

KSHV: Kaposi Sarkoma İle İlişkili İnsan Herpes Virüsü

HCV: Hepatit C Virüsü

ASHM: Aşırı Somatik Hipermutasyon

EV: Ekstraselüler Vezikül

ESCRT: Endosomal Sorting Complex Required for Transport

ISEV: Uluslararası Ekstraselüler Veziküller Derneği

1. GİRİŞ

Tümör gelişimi ve progresyonu, kanser hücreleri ve bu hücrelerin yer aldığı mikroçevre arasındaki karşılıklı ilişkiye bağlıdır. Bu ilişki sadece uzaysal etkileşimlere değil, aynı zamanda belli çözünebilir moleküller aracılığı ile kanser hücrelerinin buldukları mikroçevre ile etkileşime girme yetenekleriyle de ilişkilidir. Günümüzde kanserle ilgili temel araştırmalarda ve tümör hücre biyolojisinin altında yatan genetik değişimlerin tanımlanmasında büyük ilerlemeler kaydedilmesine karşın, kanser türleri arasında meydana gelen farklı moleküler değişikliklerin kanserin etyolojisinde ve/veya progresyonundaki rolleri hakkında henüz aydınlatılmayan birçok mekanizma bulunmaktadır.

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

Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma (DBBHL) agresif lenfomaların en yaygın tipidir ve Hodgkin-dışı lenfomaların yaklaşık %30-40'ını oluşturmaktadır. Ülkemizde DBBHL insidansı ile ilgili detaylı veriler olmamakla birlikte, 2006-2008 yıllarına ait Sağlık Bakanlığı kanser istatistik verilerine göre Hodgkin-dışı lenfomalar kadınlarda en sık görülen 8. kanser türü iken, erkeklerde 6. sırada yer almaktadır (https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanserdb/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2015.pdf). Dünya Sağlık Örgütü lenfoma sınıflandırmasına göre DBBHL; genetik, immünolojik, morfolojik ve klinik özelliklerine göre oldukça heterojen yapıya sahiptir. Bu heterojen doğası nedeniyle, hastalığın tanısı ve patogenezi ile ilgili henüz aydınlatılmayan mekanizmaları bulunmaktadır ve son yıllarda yapılan çalışmalar bu noktaya odaklanmıştır (Pasqualucci ve Dalla-Favera 2018, Schmitz vd 2018).

Günümüzde kanserin tanısı, progresyonu ve tedavi ile ilişkili kararlarda non-invaziv yöntemler kullanılmaya başlanmış olup, bu yöntemlerden biri de farklı vücut sıvılarından izole edilen tümör-kökenli ekzozomların araştırılmasıdır. Ekzozomlar, 50-100 nm çapında ve endositik orijinli membranla çevrili veziküllerdir. Hemen hemen tüm

hücrelerden salınan eksozomların DNA, RNA, protein ve lipid gibi içerdikleri moleküller aracılığı ile hücreler arası iletişimde rol oynayarak hastalıkların patogeneze ve progresyon süreçlerine katıldıkları bilinmektedir (Bennit vd 2017, Latifkar vd 2018). Literatürde, DBBHL patogenezinde eksozomların rolü ile ilgili veriler son derece sınırlıdır (Raphael vd 2014, Rutherford vd 2018).

Bu gerekçe ile tez projesinde DBBHL kökenli plazma eksozomlarının karakterizasyonuna ve içerdiklerinin tanımlanmasına odaklanılmış olup, elde edilen bulguların FFPE örneklerinden elde edilen verilerle karşılaştırılması yapıldı. Bu çerçevede B-hücre olgunlaşması sürecine ve DBBHL'da neoplastik dönüşüm sürecine katıldığı iyi bilinen "*Enhancer of Zest Homolog 2*" (*EZH2*) ve *EZH2*'nin hedef genleri olan *CDKN1A/p21*, *CDKN1B/p27*, *CDKN2A/p16* ve *CDKN2B/p15* ele alındı.

1.1.Amaç

Bu doktora tezinin amacı, öncelikle DBBHL hastaları ve sağlıklı gönüllü bireylerin plazma örneklerinden eksozom izolasyonu ve karakterizasyonunu gerçekleştirmektir. Sonrasında, *EZH2*-hedef genleri özelinde eksozomal DNA metilasyon paterni ile primer tümör DNA metilasyon paternini ve benzer şekilde eksozomal RNA ekspresyon profili ile primer tümör RNA ekspresyon profilini de karşılaştırarak aralarındaki ilişkiyi belirlemektir.

2. KURAMSAL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Hematopoez ve kan hücreleri

Hematopoez (Hemato=kan, poiesis=üretim), hematopoetik kök hücre (HKH)'lerinin kemik iliğinde üretim, çoğalma ve farklılaşma süreçlerini kapsayan olaylar zinciridir. Hematopoez sarı kesede başlar ve karaciğerden sonra kemik iliğinde devam eder. Hematopoezin yaşam boyunca gerçekleştiği primer alan kemik iliğidir.

HKH'lerin dinlenme (G0/dormant) evresinde kalarak canlılıklarının devam etmesi, belli bölgelere yerleşmeleri (homing), kendilerini yenilemeleri (self-renewal), farklılaşmaları, mobilizasyonları ve göç etmeleri gibi önemli biyolojik fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri kemik iliğinde "niş" adı verilen özellikli mikroçevrede yerleşmeleri ve zararlı etkilerden kaçmaları ile mümkün olmaktadır. HKH'leri kemik iliğinde endosteal niş (osteoblastik niş) ve vasküler niş (endotelyal niş) olmak üzere iki farklı nişte lokalizedirler. Vasküler ve endosteal niş birbirleriyle bağlantılıdır ve HKH'ler farklı koşullar altında iki nişten birini kullanırlar. HKH'ler kendini yenileme yeteneğinde ve hücre döngüsünün G0 evresinde kök hücreler iken endosteal nişte; daha olgun, proliferere olabilen ve farklılaşmaya yatkın HKH'ler ise vasküler nişte bulunurlar. Vasküler nişte bulunan hücreler, belirli aralıklarla hücre siklusuna girerek homeostaz için gerekli hematopoetik hücre ihtiyaçlarını karşılarlar.

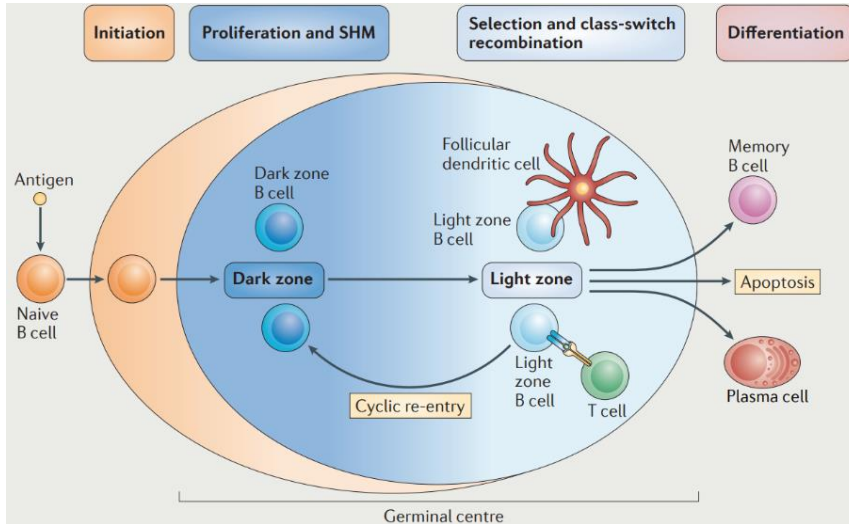
HKH'ler oldukça nadir (10^5 kemik iliği hücresine karşılık 1 adet) bulunan küçük mononükleer hücrelerdir. Yukarıda belirtildiği üzere bu hücreler ya daha fazla HKH'leri oluşturmak (self-generation) veya kararlı (committed) hücreleri oluşturmak üzere bölünürler. Bu kararlı hücreler; lenfoid seri hücrelerini oluşturan ortak lenfoid progenitör (CLP)'ler ve myeloid seri hücrelerini oluşturan ortak myeloid progenitor (CMP)'lerdir. Bu özelleşmiş hücreler de lenfositler, eritrositler, plateletler, ve nötrofiller gibi tüm kan hücrelerimizi oluştururlar (Male D vd 2017).

2.2. Lenfatik sistem ve germinal merkezler

Lenfatik sistem, lenfatik damarlardan ve lenfoid dokulardan oluşur. Lenfoid dokular primer (kemik iliği ve timüs) ve sekonder (dalak, lenf nodülleri ve mukoza-ilişkili lenfoid dokular) olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır. İnsan vücudunda yaklaşık 600 lenf nodülü bulunmaktadır ve bu nodüller yoğun lenfatik damar ağı ile çevrelenmiştir. Lenfatik damarlar, lenfatik sistemin temel hücreleri olan lenfositlerin süspansiyon olduğu lenfi

içerirler. Kapiller lenf damarları daha geniş lenf damarlarına açılır ve bu damarlar da kan damarlarına boşalarak kan dolaşımına katılırlar.

Primer lenfoid organlar lenfositlerin farklılaşmalarını ve olgunlaşmalarını sağlarken, sekonder lenfoid organlar vücuda yabancı antijenleri yakalayıp immun yanıtı oluştururlar. Germinal Merkez (GC)'ler sekonder lenfoid organlarda bulunan mikroanatomik yapılardır. GC'ler "dark" zon ve "light" zon olmak üzere iki bölüme ayrılır (Şekil 2.1). "Dark" zon, bir veya birkaç B hücrenin lenfoid folliküle girdiği bölümdür ve bu bölümde B-hücreler proliferasyon olurlar ve klonal olarak çoğalırlar. Bu hücrelere sentroblastlar denir ve sentroblastlarda birçok farklı antijenlerle etkileşime girebilecek hücrelerin oluşması amacıyla somatik hipermutasyon mekanizması başlar. "Light" zonda, B hücreleri (sentrositler) antijen sunan hücrelerin, özellikle de folliküler dendritik hücrelerin yüzeylerinde bulunan antijenle karşılaşır ve sadece sunulan bu antijen için yüksek afiniteye sahip hücreler hayatta kalırlar. Düşük afiniteli reseptöre sahip hücreler apoptozla ölürler ve GC-makrofajları tarafından fagosite edilirler. Hayatta kalan seçilmiş hücreler ise GC-antijen sunan hücrelerle etkileşime geçerler ve sonrasında sınıf değişimi (class switching) (örneğin IgM'nin IgG veya IgA'ya dönüşmesi) mekanizması başlar. Sonrasında GC-B hücreleri, anı B hücrelerine veya plazma hücre prekürsörlerine farklılaşırlar ve GC'den ayrılırlar. GC'ler maksimum boyutlarına yaklaşık 2 hafta içinde ulaşırlar ancak kaybolmaları haftalar sürebilir (Klein U vd 2006, Basso ve Dalla-Favera 2015). Bu önemli mekanizmaların gerçekleştiği yer olması nedeniyle, B-hücre lenfomalarının büyük bir bölümünün orijini GC'lerdir.



Şekil 2.1 Germinal merkezlerin hücresel ve moleküler özellikleri (Basso ve Dalla-Favera 2015).

2.3. B hücre gelişimi

B hücreler kemik iliğinden köken alırlar ve ardışık, programlı basamaklar sonucunda olgunlaşırlar (Şekil 2.2). Kemik iliğindeki hematopoetik kök hücreler; pro-B hücreler, pre-B hücreler ve sonrasında immature B hücreleri oluşturacak şekilde olgunlaşma süreci geçirirler. Sonrasında bu hücreler "transitional" B hücreler olarak kana geçerler ve oradan sekonder lenfoid organlara göç ederler. Bu aşamaya kadar gelebilen hücreler, artık periferdeki naif B hücreleridir ve atijenle karşılaşmaları halinde olgun B hücrelerine dönüşürler.

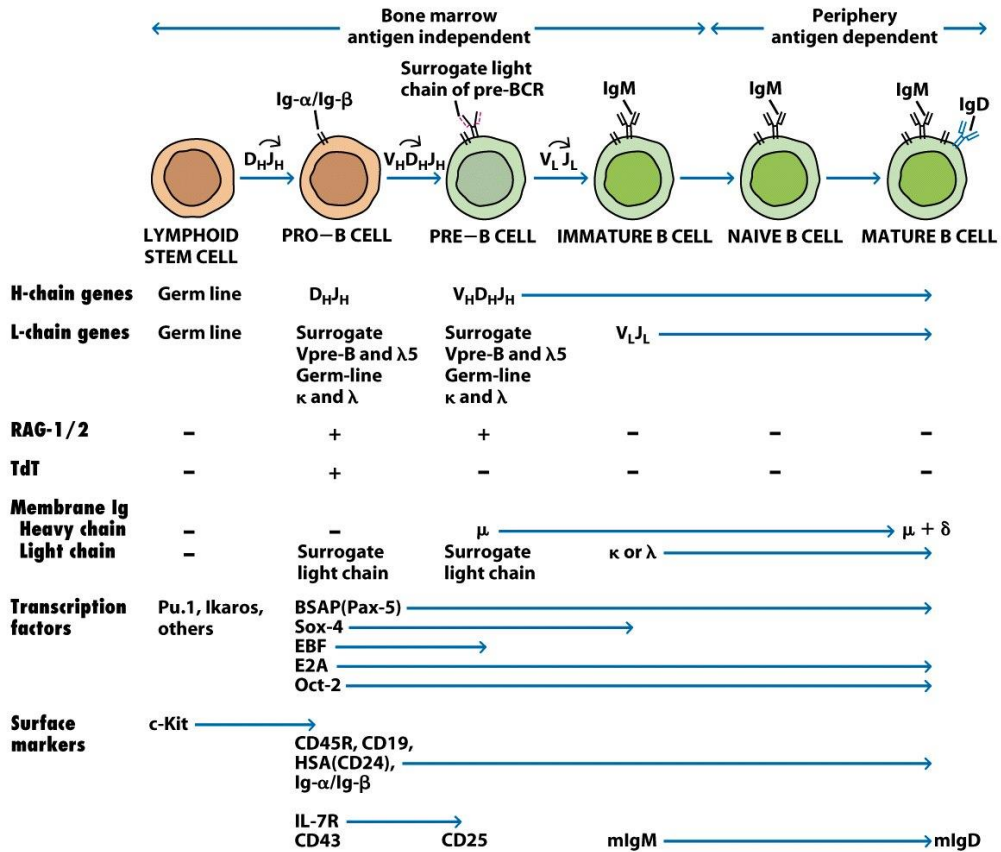
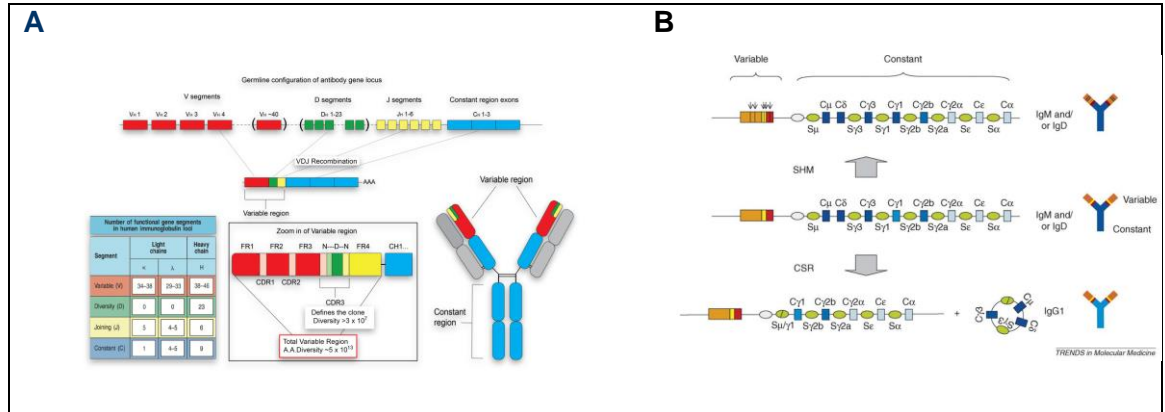


Figure 11-3
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Şekil 2.2. B hücre gelişimi. Pro-B hücrelerde ağır zincirde yeniden düzenlenmeler meydana gelirken, pre-B hücrelerde hafif zincirde yeniden düzenlenmeler başlar. İmmatür B hücreler antijenle uyarıma hazır hücrelerdir ve yüzeylerinde IgM sergilerler. Bu dönemde B hücreler fonksiyonel değildirler, fonksiyonel olabilmek için yüzeylerinde IgM ve IgD'yi birlikte eksprese etmek zorundadırlar. Ayrıca, her bir B hücre gelişim aşamasında farklı proteinleri, transkripsiyon faktörlerini ve yüzey belirteçlerini eksprese ederler (Thomas vd 2006).

İmmün sistemin çok farklı antijenleri tanımasını olanaklı kılan en önemli özelliklerinden biri, B hücrelerinin çok farklı antikor popülasyonu oluşturabilme yeteneğidir ve bu yetenek 3 farklı genetik mekanizma sayesinde kazanılır. B-hücre farklılaşmasının farklı basamaklarında gerçekleşen bu genetik mekanizmalar $V(D)J$

rekombinasyonu, somatik hipermutasyon ve sınıf-değişim rekombinasyonudur (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 (A) V(D)J rekombinasyonu (<https://www.bsse.ethz.ch/lis/research/systems-immunology.html>) ve (B) SHM ve CSR mekanizmaları ile sekonder antikor repertuarının oluşumu (de Yébenes vd 2006)

2.3.1. V(D)J rekombinasyonu

B hücrelerin yüzey reseptörleri (BCR) membrana-bağlı immunglobulin (Ig)'lerdir. Ig'ler iki identical ağır (H) zincir ve 2 identical hafif (kappa veya lambda) zincirden oluşurlar. Bu zincirler 14q32.33 lokusunda IG heavy (IGH), 2p11.2 lokusunda IG kappa (IGK) ve 22q11.2 lokusunda IG lambda (IGL) olmak üzere 3 ana lokusta lokalize genler tarafından sentezlenirler. IGH lokusu V (variable), D (diversity), J (joining) ve C (constant) gen segmentlerinden oluşurken, IGK ve IGL lokusları sadece V, J ve C gen segmentlerini içerir.

Kemik iliğinde erken B-hücre farklılaşması sırasında BCR'yi oluşturan Ig'lerin ağır (H) ve hafif (L) zincir gen bölgelerinde rastgele yeniden düzenlenmeler meydana gelir. Ig H zincir genlerinin farklı V, D ve J bölgelerinde yeniden düzenlenmeler gerçekleşirken (bu durum V(D)J rekombinasyonu olarak da adlandırılır) (Şekil 2.3-A), aynı genin L zincirinde bu yeniden düzenlenmeler V ve J bölgelerinde meydana gelir (Lefranc M. Ve Lefranc G. 2001). V (D) J rekombinasyonunun başlangıç aşamasına "rekombinasyonu aktive eden gen 1" (RAG1) ve "rekombinasyonu aktive eden gen 2" (RAG2) tarafından kodlanan RAG enzimleri eşlik eder ve DNA'nın her iki ipliğinde de kırıklar meydana gelir (Martini vd 2012). Bu mekanizma kemik iliğinde gerçekleşir ve antijen bağımsızdır. Hafif zincir genleri benzer şekilde yeniden düzenlenirler, ancak bu düzenlenme D segmentinden yoksundur. Sonuçta ağır zincir ve hafif zincirlerin bir araya gelmesi sonucunda, B-hücresi yüzeyine bağlanan ve BCR olarak görev yapan membrana bağlı Ig'ler oluşur.

2.3.2. Somatik hipermutasyon ve sınıf değişim rekombinasyonu

Olgun B hücrelerinin plazma hücrelerine ve anı B hücrelerine kadar son farklılaşma aşamaları, somatik hipermutasyon (SHM) ve sınıf-değişim rekombinasyonu (CSR) olarak adlandırılan iki rekombinasyon sürecini içerir (Şekil 2.3-B). Bu aşamalar, antijenle karşılaşmayı takiben sekonder lenfoid organların germinal merkezinde gerçekleşir. Bu nedenle DBBHL, Folliküler lenfoma (FL) gibi germinal merkez kökenli B hücreli lenfomaların yanısıra post-germinal merkez orijinli B-hücreli lenfomalarda somatik olarak mutasyona uğramış genler bulunur (Kuppers vd (1999)).

Somatik hipermutasyonlar tercihen immunglobulin ağır-zincir değişken bölgesini (IGHV) kodlayan genlerin antijenin bağlanma bölgesi olan ve komplementeriği belirleyen bölgelerinde gerçekleşir. Böylelikle antikor çeşitliliğini sağlayan ana mekanizmayı oluştururlar (Pallares vd 1999). Somatik hipermutasyon mekanizmaları tek-nükleotid mutasyonlarını ve nadiren gerçekleşen insersiyon ve delesyonları içerir (Dahlenborg, vd 2000). Sınıf-değişim rekombinasyonu, somatik hipermutasyonlardan kısa bir süre sonra gerçekleşir ve DBBHL yanısıra FL'da gözlenen bir mekanizmadır. Bu mekanizmada, C gen segmentleri yer değiştirir ve sonuçta IgM veya IgD'den IgA, IgE veya IgG oluşumuna neden olacak Ig izotip değişimi gerçekleşir (Stavnezer ve Schrader 2014). Sınıf değişim rekombinasyonu ve somatik hipermutasyonların büyük olasılıkla enzim aktivasyonu ile uyarılan sitidin deaminaz (AID) gibi bazı ortak yolakları kullandıkları düşünülmektedir. DBBHL'da AID ekspresyonu gösterilmiştir (Lossos vd 2004 Kawamura vd 2016).

2.4. Lenfoid malignansiler

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2008 sınıflaması farklı lenfoid malignansilerin tanı kriterlerinin tanımlayan bir sınıflamadır. Genetik alanındaki ilerlemeler, bu tür neoplazilerde gözlenen mutasyonal değişimlerin daha iyi karakterize edilmesine olanak sağlamıştır ve bu ilerlemelere klinik gözlemlerin eklenmesi ile tanı kriterlerinin modifiye edilmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır. Tüm bu çalışmaların sonuçları, 2016 yılında 2008 sınıflamasının revizyonu olarak yayınlanmıştır (Steven vd 2016). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2016 yılı lenfoid malignansiler sınıflaması özetle Tablo 2.1'de sunulmuştur.

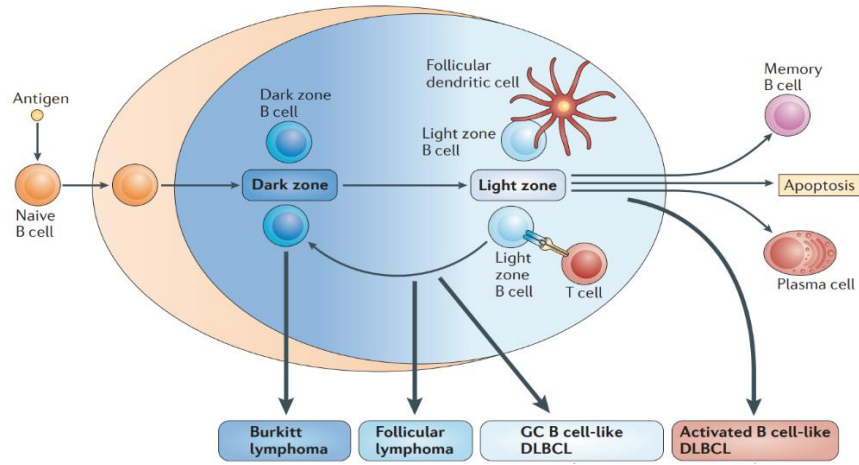
Tablo 2.1. Lenfoid, histiosit ve dendritik neoplazmların 2016 Dünya Sağlık Örgütü Sınıflaması

Olgun B hücre neoplazmları
<i>Kronik lenfositik lösemi / küçük lenfositik lenfoma ve monoklonal B hücreli lenfositoz</i>
<i>Foliküler lenfoma</i>
<i>Mantle Hücreli Lenfoma</i>
<i>Ağır Zincir Hastalığı</i>
<i>Diffüz büyük B hücreli lenfoma</i>
<i>MYC ve BCL2 ve / veya BCL6 translokasyonu taşıyan ve/veya taşımayan yüksek dereceli B hücreli lenfomalar</i>
<i>Burkitt lenfoma</i>
Olgun T hücre ve NK neoplazmları
<i>EBV ile ilişkili T-Hücre ve doğal öldürücü hücre lenfomaları</i>
<i>İntestinal T hücreli lenfomalar</i>
<i>Kutanöz T hücreli lenfomalar</i>
<i>Nodal T hücreli lenfomalar</i>
<i>Anaplastik büyük hücreli lenfomalar</i>
Hodgkin Lenfomalar
Histiositik ve dendritik hücre lenfomaları
Transplantasyon sonrası lenfoproliferaif bozukluklar (PTLD)

Gen ifadesi profili temeline dayalı 2008 sınıflandırması, DBBHL'yi germinal merkez B-hücre benzeri (GCB) ve aktive b-hücre benzeri (ABC) olmak üzere 2 alt gruba ayırmaktadır. Birçok merkezde gen ekspresyon profillemesi rutin pratikte kullanılmadığından, bu alt grupların belirlenmesinde daha kolay uygulanabilir olan ve CD10, BCL6 ve IRF4 / MUM1 immünohistokimyasal boyamasına dayanan Hans algoritması kullanılmaktadır. Ancak, 2016 sınıflandırmasında tüm yeni tanı alan DBBHL hastalarının gen ekspresyon profiline göre alt gruplarının belirlenmesi yer almaktadır. Sınıflamada önemli bir değişim de MYC, BCL2 (birlikte “double hit”) ve BCL6 (birlikte “triple hit”) translokasyonlarını içeren yüksek-grade B hücre lenfoma alt grubudur.

2.5. Olgun B hücre neoplazmları

Daha önce de belirtildiği üzere GC'ler, B-hücrelerinin yüksek afiniteli antikoları oluşturmak üzere farklı genetik süreçleri geçirdikleri anatomik lokalizasyonlardır. Nadir görülen lenfoblastik ve mantle-hücre lenfoma alt tipleri dışında, tüm B-hücre Hodgkin-dışı lenfoma (Non-Hodgkin Lymphoma, NHL)'larda, *IgV* genlerinde somatik mutasyonlar (hipermutasyona uğramış *IgV* genleri) gözlenir ve bu da bize bu lenfomaların GC içinde bloklanan veya GC'den geçen B-hücrelerden köken aldıklarını gösterir. Bu lenfomalar, B-hücresinin hangi aşamada etkilendiğine bağlı olarak sınıflandırılırlar (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Farklı olgunlaşma evrelerinde bloke edilen B hücrelerinden köken alan GC-kökenli lenfoma tipleri (Basso ve Dalla-Favera 2015).

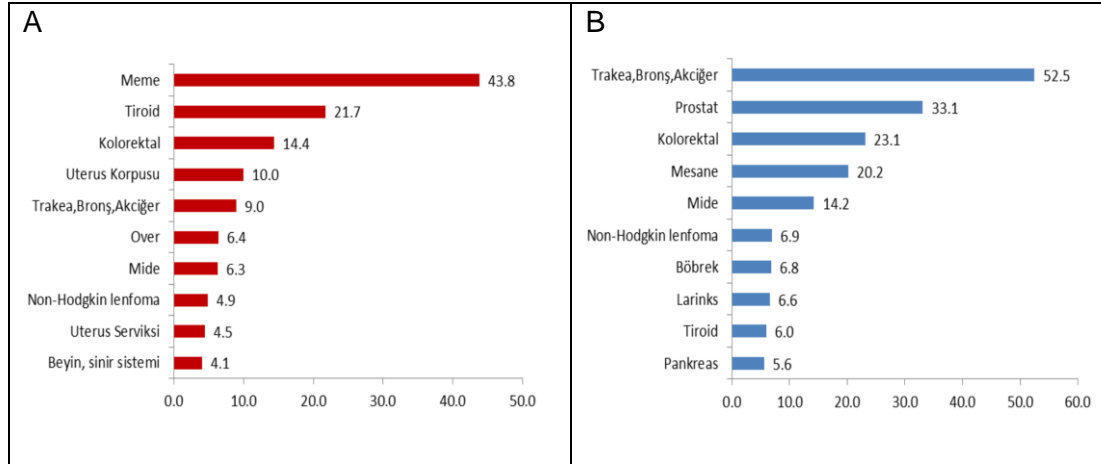
Temel olarak olgun B-hücre neoplazmalarının alt tiplerinin genomları iki tip genetik lezyonla karakterizedir: Kromozomal translokasyonlar ve aşırı somatik hipermutasyonlar. Bu lezyonlar Ig gen yeniden düzenlenme mekanizmasındaki hatalardan veya sınıf-switch rekombinasyonların regülasyonundaki bozulmalardan kaynaklanmaktadır (Dalla-Favera 2017). Aşırı somatik hipermutasyonlar, sıklıkla B-hücre NHL alt tipi olan Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma (DBBHL) ile ilişkilidir (Bohers vd 2015, Caner vd 2015).

2.6. Diffüz Büyük B-hücreli lenfoma

2.6.1. Epidemiyoloji

DBBHL, non-Hodgkin lenfomaların en yaygın gözlenen tipidir ve bu lenfomaların yaklaşık %30-40'ını oluşturmaktadır. Dünyada DBBHL ile ilgili epidemiyolojik veriler sınırlı olmakla birlikte yıllar içinde insidansın arttığı görülmektedir. Bu artan insidansla ilişkili önemli faktörler arasında kanser raporlarının düzenli tutulması, çok daha duyarlı tanı yöntemlerinin kullanılması (özellikle borderline lezyonlar için), lenfoproliferatif hastalıkların sınıflandırılmasındaki değişiklikler ve AIDS'le-ilişkili DBBHL sıklığındaki artışlar yer almaktadır (Flowers vd 2010). Amerika'da yıllık hastalık insidansı 100.000'de 7 olarak rapor edilmiştir (Li vd 2015). Tüm non-Hodgkin lenfomalarda olduğu gibi, %55 görülme oranı ile erkeklerde daha yaygın gözlenmesine karşın, bu fark cinsiyet özelinde hastalıkla ilgili risk oluşturmamaktadır. Yaşla birlikte, hastalığın görülme sıklığı artmaktadır ve ortalama tanı alma yaşı 64 olarak kabul edilmektedir. DBBHL'li hastalardan oluşan aileler tanımlanmıştır. Geniş katılımlı bir popülasyon çalışmasında, DBBHL tanısını alan probandin akrabalarında hastalığın gelişme riskinin 3.5 kat arttığı hesaplanmıştır (Goldin vd 2005).

DBBHL özelinde olmamakla birlikte, Türkiye’de 2015 yılına ait Sağlık Bakanlığı kanser istatistik verilerine göre NHL’lar kadınlarda en sık görülen 8.kanser türü iken (insidans 100.000’de 4.9), erkeklerde 6. sırada (insidans 100.000’de 6.9) yer almaktadır (Şekil 2.5). Tüm yaş gruplarında hem erkeklerde hem de kadınlarda en sık görülen kanserler arasında %2.8 ile aynı görülme yüzdesine sahiptirler (https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanserdb/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2015.pdf).



Şekil 2.5. TC Sağlık Bakanlığı 2015 Türkiye Kanser İstatistik verilerine göre kadınlarda (A) ve erkeklerde (B) en sık görülen 10 kanser türü insidansı (100.000 bireyde)

2.6.2. Risk Faktörleri

DBBHL’da yaş önemli bir risk faktörüdür ve yetişkin bireylerde görülen tüm lenfomaların yaklaşık 1/3’ünü oluşturmaktadır. Olguların büyük bir çoğunluğunda etiyoloji tam olarak bilinmemektedir, ancak genetik faktörlerin, komorbid hastalıkların veya bu hastalıklarda uygulanan tedavilerin (özellikle immunbaskılayıcı ajan kullanımı) yanısıra ultraviyole radyasyon, pestisitler, saç boyaları ve diyet gibi çevresel faktörlerin de hastalık riskini arttırdığı bilinmektedir.

DBBHL’da lenfomagenezin moleküler mekanizmalarını araştıran vaka-kontrol çalışmaları inflamatuvar yollar, lenfoid hücre döngüsü, apoptoz ve proliferasyon gibi önemli hücresel yollara odaklanmıştır. Her ne kadar DBBHL için tek bir duyarlılık geni tanımlenemese de, DBBHL etiyolojisinin altında yatan genetik predispozisyonla ilgili önemli veriler elde edilmiştir. Bu veriler sırası ile 1) DBBHL riski, hematolojik malignensi aile öyküsü bulunan bireylerde artış göstermektedir, 2) DBBHL insidans oranı göçmen bireylerde sabittir ve kendi ülkelerindeki paterne sahiptir, ve 3) Lenfomalı bireylerde bazı genetik varyasyonlar belirlenmiştir (Flowers CR vd 2010).

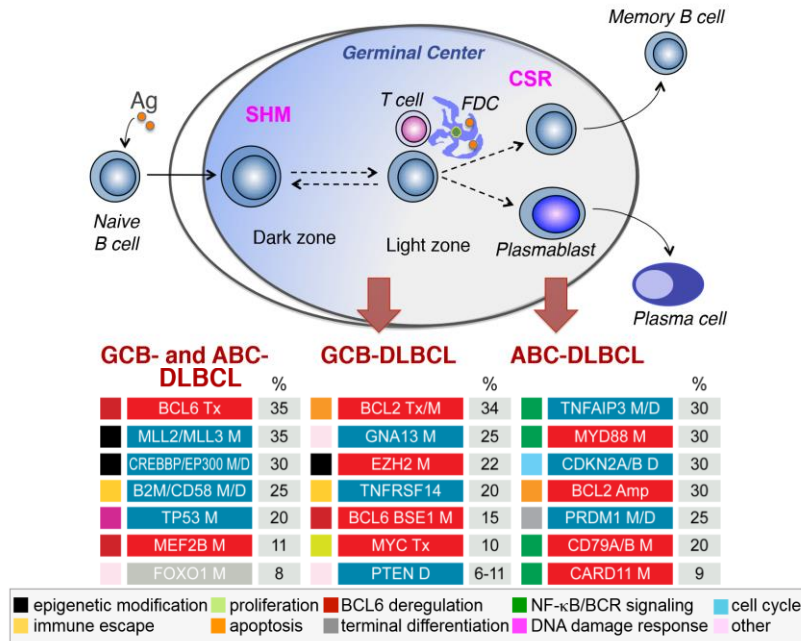
Viral enfeksiyonlar ve immun sistemi baskılayan durumlarla (otoimmün hastalıklar, organ transplantları, primer veya kazanılmış immünyetmezlik gibi) immun sistemi

baskılayan tedavilerin DBBHL riskini arttırdığı bilinmektedir. Özellikle Epstein-Barr virüsü (EBV), Kaposi sarkoma-ile ilişkili insan herpes virus (KSHV), HIV, Hepatit C virusu (HCV) gibi mikroorganizmalar tarafından oluşturulan viral infeksiyonların hastalık riski ile önemli ilişkisi olduğu belirlenmiştir (Bhavsar vd 2017, Meister vd 2018). Ancak infeksiyöz patojenlerin konak hücrelerde lenfomagenezi veya B-hücre proliferasyonuna neden olan antijenik uyarımı başlatan mutasyonlara neden olup olmadıkları ya da tümör gelişimini uyaran immunsupresyona neden olup olmadıkları henüz bilinmemektedir. Sonuç olarak DBBHL’da risk faktörleri multifaktöriyel görünmektedir.

2.6.3. Patogenez

2.6.3.1. Genetik faktörler

DBBHL, klinik ve genetik olarak oldukça heterojen bir hastalıktır. Heterojen doğası ile uyumlu olacak biçimde, DBBHL patogenezini proto-onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonlarındaki değişimler başta olmak üzere birçok genetik anormallikleri barındıran çok basamaklı bir süreci kapsamaktadır. Bununla birlikte DBBHL genomu, B lenfositlerin fizyolojik Ig DNA yeniden düzenlenmesi ile ilişkili olarak iki temel genetik hasar mekanizması ile şekillenmektedir. Bu mekanizmalardan ilki, V(D)J rekombinasyonu, SHM ve CSR sırasında meydana gelen hatalar sonucu oluşan kromozomal translokasyonlardır. Diğer mekanizma da AID-araçlı SHM mekanizmasının yan ürünü olan aşırı somatik hipermutasyonlardır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. DBBHL alt tipleri ile ilişkili genetik değişimler. Panelde mavi renk fonksiyon-kayıbı ile ilişkili sonuçlara ve kırmızı renk fonksiyon-kazanımı ile ilişkili sonuçlara neden olan değişimleri yansıtmaktadır. M: Mutasyon, D: Delesyon, Tx: Kromozomal translokasyon, Amp: Amplifikasyon, (Pasqualucci ve Dalla-Favera 2018)

DBBHL'da en yaygın gözlenen translokasyonlar t(3q27;?) (BCL6 translokasyonu), t(8;14)(q24;q32) / t(8;?), ve t(14;18)(q32;q21)'dir. DBBHL ile ilişkili translokasyonlar tipik olarak füzyon proteinleri oluşturmazlar. Bunun yerine proto-onkogenin kodlama yapan domainlerine yakın bölgelerde, partner kromozomlardan köken alan düzenleyici dizileri (promoter'lar ve enhancer'lar) yan yana getirirler ve bu durum normal proteinlerin ekspresyonlarında deregülasyona neden olur. Sonuçta, pre-neoplastik hücrede regüle edilen proto-onkogen, lenfoma hücresinde de yapısal olarak eksprese edilmeye başlar (örn; BCL6 translokasyonları) ya da tümör prekürsör hücrede normal olarak eksprese olmayan proto-onkogenler, lenfoma hücrelerinde anormal bir biçimde aktive olabilirler (örn; MYC ve BCL2 translokasyonları) (Pasqualucci ve Dalla-Favera 2018).

Aşırı somatik hipermutasyon (ASHM), GC B hücrelerinde mutasyona uğramamış genlerin genellikle 5' dizilerinde birçok mutasyonun birikimine neden olan genetik hasar mekanizmasını tanımlamak için kullanılan bir terminolojidir. Fizyolojik olarak gerçekleşen SHM aktivitesinin yüksek doğrulukta tamir mekanizmalarına gereksinim duyduğu açıktır. Sonuçta sadece IG lokusları ve BCL6 gibi birkaç ek lokus, GC B hücrelerinde SHM'nun varlığını gösterir. Bunun aksine, yeni tanı alan DBBHL hastalarının yarısından fazlasında IG lokusları dışında MYC gibi proto-onkogenleri de içeren 20'den fazla gende ASHM'nin varlığı gözlenmektedir. DBBHL genomu (Mb başına 3.3-4.21 mutasyon) diğer hematolojik malignansilerden (örn. KLL'de Mb başına 1 mutasyon) çok daha kompleksdir, ancak solid tümörlerle karşılaştırıldığında (örn. Melanomada Mb başına 12.9 mutasyon) bu belirgin karmaşıklığı azalmaktadır (Amin vd 2017, Reddy vd 2017, Pasqualucci ve Dalla-Favera, 2018). Birçok proto-onkogen ve tümör baskılayıcı genin fonksiyonlarını bozarak malign transformasyon için önemli bir mekanizmayı oluşturmasına karşın, kompleks genetik değişikliklere yol açması nedeni ile henüz DBBHL patogenezinde ASHM mekanizması net olarak aydınlatılamamıştır. Tablo 2.2'de günümüze kadar yapılan genomik çalışmalarından elde edilen verilere göre DBBHL hastalarının yaklaşık %10'unda görülen mutasyonlar yer almaktadır.

Tablo 2.2. DBBHL’de en sık gözlenen mutasyonların alt gruplardaki dağılımları*

Gen	Toplam	ABC-DBBHL (%)	GCB-DBBHL (%)
KMT2D	32.1	40.5	46.0
CREBBP	17.3	6.0	31.0
PIM1	16.4	33.0	8.5
TP53	15.7	18.0	15.5
B2M	14.7	15.0	11.0
TNFAIP3	14.7	15.0	11.0
GNA13	14.1	8.5	12.0
MYD88	13.7	28.0	10.0
MEF2B	13.5	12.0	23.0
TNFRSF14	12.8	2.0	17.0
SOCS1	11.8	6.0	15.5
CD79B	11.3	25.0	2.5
CARD11	10.8	13.5	7.0
BCL2	10.6	1.0	24.0
EP300	10.4	15.0	14.5
PRDM1	9.6	16.0	6.0
EZH2	9.2	0.0	18.0
CD58	8.3	6.0	10.0

*: Pasqualucci vd 2011, Lohr vd 2012, Morin vd 2013, Dubois vd 2016 çalışmalarından elde edilen veriler.

GCB DBBHL’da özellikle histon modifikasyonlarını etkileyen mutasyonlar sıklıkla görülmektedir. En iyi örnek te *EZH2*’dir ve ABC alt tipinde bu gende mutasyon gözlenmezken, GCB alt tipinde olguların yaklaşık %22’sinde mutasyon gözlenmektedir. GCB alt tipine özel olmamakla birlikte, DBBHL hastalarının yaklaşık %25’inde histon asetiltransferazları kodlayan CREBBP ve EP300 genlerinde mutasyonlar gözlenmektedir. İnaktive edici bu mutasyonlar nedeniyle histon asetilasyon dengesinin bozulması başta BCL2 ve P53 gibi genlerin etkinliği bozar ve böylelikle DBBHL patogenezinde önemli rol oynarlar. ABC DBBHL’da ise mutasyonlar sıklıkla BCR ve Toll-benzeri reseptör (TLR)’lerin sinyal yollarında rol oynayan adaptör proteinleri kodlayan genlerde gözlenir ve bu mutasyonlar NF- κ B sinyal iletim yolağının sürekli aktivasyonuna neden olurlar (Amin vd 2017, Pasqualucci ve Dalla-Favera 2018). DBBHL olgularının yaklaşık 1/3’ünde gözlenen *MYD88* mutasyonu, bir fonksiyon kazanım mutasyonudur ve TLR sinyal iletim yolağı uyarılarak NF- κ B ve JAK/STAT sinyal iletim yolağı aktive olur (Ngo vd 2011). BCL2’de amplifikasyon ve CDKN2A/2B’de homozigot kayıplar, ABC alt tipinde yaygın gözlenen değişimlerdendir (Lenz vd 2008). Ayrıca, bu mutasyonlardan birçoğu prognostik faktör olarak da değerlendirilmektedir. Örneğin *EZH2* ve *CD79* mutasyonları GCB DBBHL’da iyi prognozla ilişkili bulunurken, *MYD88* mutasyonu ABC DBBHL’da kötü prognozla ilişkilidir (Lee vd 2014, Rovira vd 2016).

2.6.3.2. Epigenetik değişimler

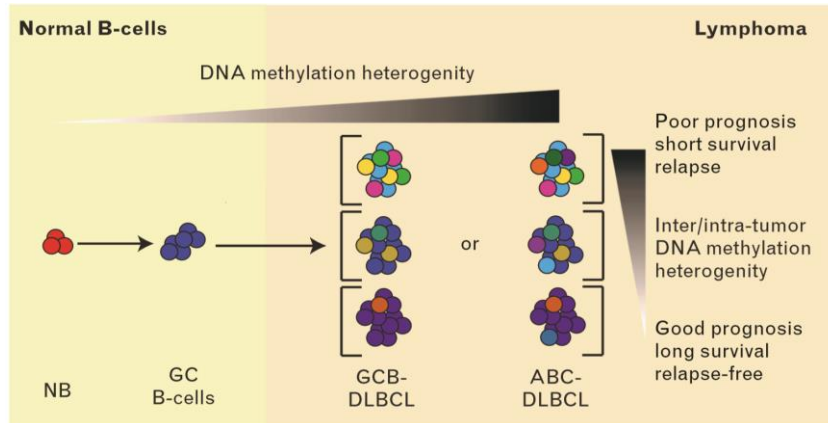
DBBHL'da epigenetik mekanizmalarda gözlenen mutasyonlar ve epigenetik paternin bozulması sıklıkla gözlenen olaylardır. *EZH2* ve *MLL2* gibi histon metiltransferazları, *CREBBP* ve *EP300* gibi histon asetiltransferazları etkileyen somatik mutasyonlar lenfomanın bu tipinde gözlenen ortak değişimler arasında yer almaktadır. Bu mutasyonlar kromatin yapısının değişmesine ve bazı proteinlerin fonksiyonunun bozulmasına neden olurlar ve sonuçta birçok genin yer aldığı mekanizmaları etkileyecek şekilde transkripsiyonal programlanmaya neden olurlar. Histon modifikasyonları, kodlama yapmayan RNA'lar ve kromatin yeniden düzenlenme mekanizmaları epigenetik değişimler arasında yer almasına karşın, tez çalışması ile ilgili olduğundan bu bölümde DNA metilasyonu üzerinde durulacaktır.

DNA metilasyonu epigenetik mekanizmalar arasında tek kalıtılabilir epigenetik belirteç olması ve uzun süreli etkiye sahip olması nedeniyle, varolan DNA metilasyon paternlerinin yavru hücrelere doğru aktarımı ve korunması, hücre döngüsünün önemli bir mekanizmasıdır. DNA metilasyonu en azından 3 farklı mekanizma ile transkripsiyonal sessizleşmeye neden olabilir. Bu mekanizmalar "i) CpG metilasyonu, dizi-spesifik transkripsiyon faktörlerinin (E2F, CREB ve c-myc gibi) bağlanmasını kendiliğinden inhibe eder, ii) CpG metilasyonu, nükleozom pozisyonunda değişikliğe neden olur ve iii) CpG metilasyonu, metile CpG dinükleotidlerini tanıyan diğer nüklear faktörleri bölgeye toplar ve transkripsiyon faktörleri gibi diğer faktörlerin bağlanmasını geciktirir" olarak sınıflandırılabilirler.

Uzun bir süredir kanser epigenomlarının normal karşılıklarından farklı olduğu bilinmektedir (Pan vd 2015, Jiang vd 2015). Normal B hücreler ve DBBHL hücrelerinin de epigenomları farklıdır ve bu farklılıkları tartışmadan önce, epigenomla ilgili 3 önemli kavramın her zaman akılda tutulması uygun olacaktır. Bunlardan ilki, epigenetik modifikasyonun genomun belli bölgeleri ile ilişkili olmasıdır. Örneğin, yukarıda da tartıştığımız gibi DNA metilasyonunun lokalizasyonu, DNA metilasyonunun etkinliği ile son derece yakından ilişkilidir. Bir başka ifade ile, CpG'den zengin gen promotorlarında DNA metilasyonu genin sessizleşmesinden sorumludur. DBBHL patogeneğinde de DNA metilasyonunun etkinliği, metilasyonun gerçekleştiği lokalizasyon bağımlıdır, çünkü aşırı metilasyon paternine gen promoter'ların proksimal bölgelerinde ve belli kromozomal lokuslarında rastlanılır (De vd 2013). Bir diğer önemli özellik de, genomik DNA dizisinin aksine, sitozin metilasyon dağılımının plastisitesinin yüksek olmasıdır ki bu da bize

çevresel değişimlere yanıt olarak veya transkripsiyonu regüle eden faktörlerin etkisi ile dinamik olarak yeniden şekillenebileceğini göstermektedir. Aslında plastisite, naif B hücrelerinin GC'leri oluşturmak üzere aktive B hücrelerine dönüşümü gibi, hücrelerin bir fenotipik formdan başka bir fenotipik forma hızlıca dönüşebilmesini sağlaması açısından son derece önemlidir. Ancak, aynı zamanda plastisite, hücre proliferasyonu ve strese maruz kalma durumlarında da sıklıkla gözlenir ki, hücre proliferasyonu DBBHL'nın karakteristik özelliklerinden biridir (Shaknovich vd 2011). Plastisite nedeniyle, epigenetik belirteçlerin rastgele değişmesi, bazı hücrelerde önemli yararlar sağlayabilir ve somatik mutasyonlardan bağımsız olarak hücre proliferasyonuna neden olarak klonal çoğalmadan sorumlu olabilirler.

Genetik heterojeniteye benzer şekilde, tümör hücreleri arasında sitozin metilasyon paterni farklı olabilir ve yeni oluşan hücrelere bu patern aktarılabilir. DBBHL hastalarında yüksek çözünürlüklü dizi analiz yöntemleri ve mikroarray platformları kullanılarak DNA metilasyon heterojenitesi araştırılmıştır. De ve ark., normal B hücreleri ve lenfoma hücrelerinde DNA metilasyon paternini belirleyen ve DBBHL'da inter- ve intra-tümör epigenetik heterojenitenin hastalığın prognozu ve sağkalımı ile ilişkili olduğunu belirleyen ilk çalışmayı yapmışlardır (De vd 2013). Bu çalışmanın verilerine dayanılarak, DBBHL hastaları arasındaki DNA metilasyon farklılıklarının hastalığın biyolojik heterojenitesinin açıklamada ek bilgiler sağlayabileceği hipotezi ile 2014 yılında yapılan bir çalışmada, DBBHL'da DNA metilasyon paternine göre yeni epigenetik altgrupların varlığı belirlenmiş ve bu altgrupların sağkalımla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Chambwe vd 2014). Sonuç olarak, DBBHL altgruplarında DNA metilasyon paternleri farklıdır ve bu farklılık sağkalımla ilişkilidir (Şekil 2.7).

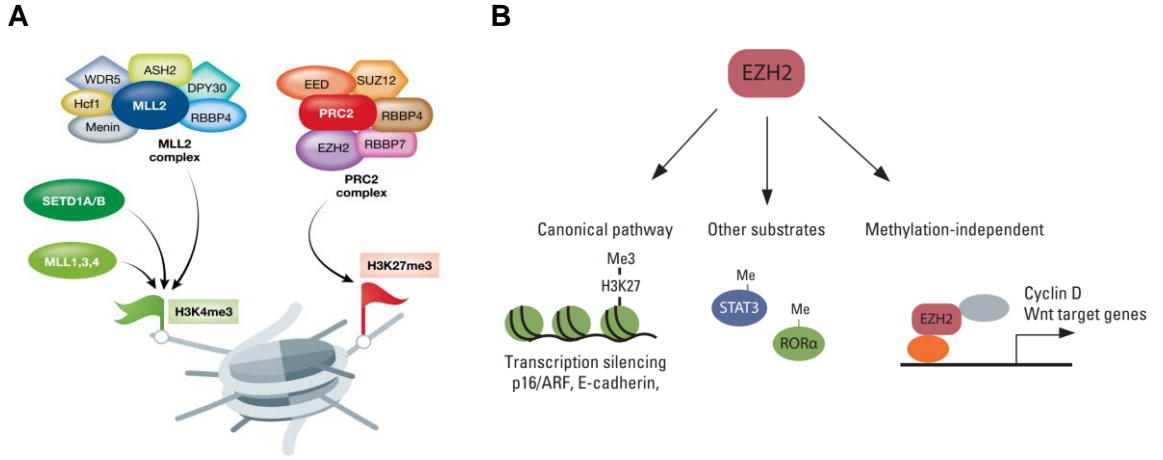


Şekil 2.7. Normal B hücresi ve DBBHL'de DNA metilasyon heterojenitesi. Bu heterojenite GC B hücrelerinde başlar ve lenfoma hücrelerinin oluşumuna kadar giderek artan seviyede ilerler. DBBHL'nin agresif özelliği ve klinik sonucu intra- ve inter- tümör DNA metilasyon heterojenite derecesi ile koreledir (Jiang vd 2016).

Epigenetik mekanizmalarla ilgili en önemli özelliklerden biri de, epigenetik mekanizmaların tek başlarına değil de diğer mekanizmalarla birlikte değerlendirilmelidir. Bir başka ifade ile genomdaki bir bölgenin işlevselliği o bölge ve ilgili lokalizasyonlarda varolan epigenetik değişimlerin toplamının bir sonucudur. Birçok çalışmada tek bir epigenetik belirtece odaklanmak, elde edilen verilerin kolay analiz edilebilmesini sağlaması açısından tercih edilmektedir. Ancak, bu tür değişimler genomda henüz detaylarını tam olarak tanımlayamadığımız çok daha karmaşık mekanizmaları yönlendirirler (Jiang ve Melnick 2015). DBBHL’de buna en iyi örnek, gen promotorlarında baskılama belirteci olan H3K27me3 ile aktive edici belirteç olan H3K4me3’ün kombinasyonu ile karakterize “bivalent” kromatin bölgeleridir ve bu belirteçler “transkripsiyonal denge” (transcriptional poising) ile ilişkilidirler.

2.7. EZH2

EZH2, Polikomb Baskılayıcı Kompleks 2 (PRC2)’nin katalitik alt ünitesidir ve bir histon metil transferazdır. Birçok kanser türünde (prostat kanseri, meme kanseri, lenfoma, myeloma, mesane kanseri, kolon kanseri, akciğer kanseri, endometrial kanserler, karaciğer kanseri, gastrit kanseri) ekspresyonunun arttığı bilinmektedir (Comet vd 2016). Epigenetik mekanizmalarda önemli rol oynayan *EZH2*, PRC2’nin diğer alt üniteleri (EED, SUZ12, RBBP4 ya da RBBP7) ile birlikte histon proteini 3 (H3)’ün 27. lizin rezidüsünün trimetilasyonunu (H3K27me3) katalizler ve böylece hedef genlerinin epigenetik olarak sessizleştirilmelerini düzenler (Şekil 2.8-A). Bir başka ifade ile H3K27me3 belirteci transkripsiyonel sessizleşmeden sorumludur ve özellikle *CDKN1A*, *CDKN2A* ve *CDKN2B* genlerini de içeren birçok genin transkripsiyonel düzeyde baskılanmasına neden olur (Şekil 2.8-B) (Cao vd 2002, Yamaguchi ve Hung 2014). Dolayısıyla, bu hedef genlerin birçoğunun hücre döngüsü kontrol noktaları ve hücre farklılaşmasıyla ilişkili olması, *EZH2*’nin temel rolünün hücre proliferasyonunu ve hücrenin kendini yenilemesini destekleyici yönde olduğunu göstermektedir. Bu verileri destekler nitelikte, *EZH2*’nin undiferansiye kök hücre ve progenitör hücrelerde eksprese olurken, somatik hücrelerde predominant olarak inaktif olduğu rapor edilmiştir (Esteller vd 2013, Harikumar ve Meshorer 2015).



Şekil. 2.8. EZH2'nin katalitik alt ünitesi ve farklı fonksiyonları **A.** EZH2'nin katalitik alt ünite olarak görev yaptığı PRC2 kompleksi H3K27 metilasyonundan sorumludur. Şekilde yer alan bivalent kromatin belirteçlerinden diğeri de H3K4 metilasyonudur ve bu belirteçten de MLL2 kompleksi sorumludur (Harikumar ve Meshorer 2015). **B.** Kanserde EZH2'nin farklı fonksiyonları. EZH2, H3K27me3 aracılığı ile CDKN2A (p16) ve E-kaderin gibi birçok tümör baskılayıcı genin epigenetik sessizleştirilmesinden sorumludur. EZH2, H3K27 dışında STAT3 ve RORα gibi substratlara da metil gruplarını ekler. Metilasyon dışında, EZH2'nin mutasyonları da kanserde rol oynar (Yamaguchi ve Hung 2014).

Histon proteinlerinin N-terminal domainlerinde gerçekleşen farklı post-translasyonel modifikasyonlar, gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde önemli mekanizmalardır ve hücre proliferasyonu gibi önemli biyolojik olaylarda rol oynarlar. Farklı histon modifikasyonları, önemli regülatör genlerin aktif ve inaktif olma durumlarından sorumludurlar. Örneğin, H3K4me belirteçine sahip aktif promoter'lar ve H3K27me belirteçine sahip inaktif bölgeler gibi. Tüm bu belirteçler, genom boyunda kromatinin açık veya kapalı konformasyonlarından sorumludurlar ve böylelikle regülatör proteinlerin ve transkripsiyon faktörlerinin kromatine ulaşılabilirliğini düzenlerler. Sonuçta, bu motifler hücreye özgün fonksiyonları düzenlerler. EZH2 histon metiltransferazı da, kritik GC B hücre promoter'larında bivalent kromatin domain'lerinin oluşmasından sorumludurlar ve böylelikle lenfomagenezi başlatırlar. GC B hücrelerinde *EZH2*'nin 1000'den fazla yeni bivalent işaretli promoter'ların *de novo* oluşumundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu domainlerin hemen hemen hepsinin dinlenme evresindeki B hücrelerinde bulunan H3K4me3 promoter'ları ile örtüşmektedir (Beguelin vd 2013). *EZH2*'nin bu hedef genlerinden birçoğu GC B hücrelerine spesifiktir ve GC B hücrelerinde *EZH2* geni hücre proliferasyonda ve hücre farklılaşmasında görev yapan genlerin dinamik dengesini düzenlerler.

EZH2, en azından *CDKN1A* gibi hücre döngüsü kontrol noktalarında görev yapan genlerin baskılanmasına neden olarak GC oluşumuna katılır (Béguelin vd 2013). *EZH2*, aynı zamanda *CDKN2A* gibi plazma hücre farklılaşmasında rol oynayan genleri baskırlar ve böylelikle GC fenotipinin korunmasında önemli rol oynarlar (Hatzi vd 2014). *EZH2*'nin fonksiyon kaybı fenotipi, GC fenotipinin ana regülatörü olan BCL6'daki fonksiyon kaybı fenotipine oldukça benzerdir. *EZH2* ve BCL6, GC B hücrelerinde birçok ortak geni hedefler (Béguelin vd 2016).

Özetle, DBBHL patogenezinde *EZH2*'nin ekspresyonu ve beraberinde B-hücre proliferasyonu yer alır. Bazı DBBHL olgularında *EZH2*'nin aşırı ekspresyonu gözlenir ve durumdan *EZH2*'nin SET domainindeki (H3K27me'den sorumlu) mutasyonlar sorumlu tutulmaktadır (Schmitz vd 2018). DBBHL'da GCB-benzeri immunofenotipe sahip olgularının yaklaşık %20'sinde *EZH2* mutant tümör hücrelerinin varlığının bildirilmesine karşın, bu konuda tam bir konsensus sağlanmış değildir (Çetin vd 2016). *EZH2*'nin B-hücre olgunlaşması sürecine ve DBBHL'da neoplastik dönüşüm sürecine katıldığı ile ilgili bu önemli verilere rağmen, yukarıda tartışılan fonksiyon-kazanım mutasyonu dışında, detaylı mekanizması henüz netlik kazanmamıştır.

2.7.1. EZH2 hedef genleri: Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri

Kanser, en basit açıklama ile hücre büyümesi ve hücre ölümü arasındaki dengesizlikten kaynaklanmaktadır. Hücre döngüsü kontrol proteinlerinin görevi ise bu dengeyi yönetmektir. Siklinler, siklin bağımlı kinaz (CDK)'lar ve CDK inhibitör (CDKN)'ler hücre döngüsünün spesifik fazlarını sıkı bir şekilde düzenleyen temel proteinlerdir. Hücre döngüsünü düzenleyen en önemli CDK'lar arasında CDK1, CDK2, CDK4 ve CDK6 yer almaktadır. CDK'lar aktive olmak için siklinlerin varlığına ihtiyaç duyarlar. Ökaryotlarda, hücre döngüsünün farklı evrelerinde rol oynayan birçok farklı siklinler bulunmaktadır ve tüm siklinler ilişkili oldukları hücre döngüsünün evrelerine bağımlı olarak adlandırılırlar (örn; G1-faz siklinleri). CDK aktivasyonunun regülasyonu da oldukça karmaşık mekanizmalar tarafından yönlendirilir. Bu mekanizmalar 4 basamakta özetlenebilir; i) özgün siklin proteinin bağlanması, ii) fosforilasyonun aktivasyonu, iii) aktivasyonu takiben CDK'nın ATP-bağlanma bölgesinin aktivitesinin baskılanması ve iv) CDKN'lerin bağlanması.

EZH2'nin en önemli hedef genlerinden olan CDKN'ler, yukarıda da açıklandığı üzere hücre döngüsünün negatif kontrolünden sorumludurlar. Evrimsel orijinlerine, yapılarına ve CDK özgünlüklerine dayanılarak 2 tip *CDKN* gen ailesi tanımlanmıştır. İlk aile INK4 gen ailesidir ve bu aile üyeleri CDKN2B (p15), CDKN2A (p16), CDKN2C (p18) ve CDKN2D (p19) proteinlerini kodlar. Bu proteinler CDK4 ve CDK6'ya bağlanarak bu

CDK'ların kinaz aktivitelerini inhibe ederler. Diğer aile *CIP/KIP* ailesidir bu aile üyeleri CDKN1A (p21), CDKN1B (p27) ve CDKN1C (p57) proteinlerini kodlar. Bu aile üyeleri hem siklinlere hem de CDK alt ünitelerine bağlanırlar ve siklin D, E, A ve B-CDK komplekslerinin aktivitelerini düzenlerler (Besson vd 2008).

İlk klonlanan *KIP* ailesi üyesi CDKN, *CDKN1A*'dır ve DNA hasarına karşı oluşan yanıtta hücre döngüsünün G1 evresinin engellenmesinden sorumludur (Gartel vd 1996, Nakanishi vd 1999). Xiong ve arkadaşları ilk olarak 1992'de bilinmeyen bir fonksiyona sahip 21 kDa'lık bir proteinin saptanmasıyla p21'i (CDKN1A) tanımlamışlardır. Ancak CDKN1A'yı siklin D1 ve D3'ün bir bağlanma partneri olarak belirlemişlerdir (Xiong ve Zhang 1992). Ayrıca, CDKN1A'nın çoğalan hücre nükleer antijeni (PCNA) olarak adlandırılan başka bir protein ile ilişkili olduğunu ve PCNA, siklin D1, CDK2 ve CDKN1A'nın bir kuartern yapı oluşturduğunu öne sürmüşlerdir. Sonrasında aynı grup, CDKN1A'nın, CDK'ların evrensel bir inhibitörü olarak işlev gördüğünü göstermişlerdir (Xiong vd 1993).

CDKN1A, hücre döngüsü progresyonunu G1'den S fazına geçerken regüle etmektedir. Hücre gelişiminin engellenmesinin yanı sıra hücre sel sağkalımı da düzenlemektedir. Bu genin ekspresyonu p53 tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir (Bringold F vd. 2000). Temel fonksiyonu hücre döngüsünü durdurmak ya da yavaşlatmak olduğundan, önemli bir hücre döngüsü inhibitör proteini olarak bilinmektedir.

CDKN1A'nın keşfiyle neredeyse eş zamanlı yapılan bir başka çalışmada ise CDKN1A ile benzer büyüklükteki ve işlevdeki bir protein daha analiz edilmiştir. Bu çalışma, siklin-E-CDK2 komplekslerinin inhibisyonuna aracılık eden yeni bir proteinin varlığını ortaya koymuştur (Koff vd 1993). Bu protein CDKN1B (p27)'dir ve sonrasında bir seri biyokimyasal analizlerle izole edilerek, fonksiyonu doğrulanmıştır (Polyak vd 1994). İnsanda *CDKN1B*'yi kodlayan gen kromozom 12p13 bölgesinde lokalizedir. Bu kromozomal bölge, lenfoid ve miyeloid malignitelere kromozomal translokasyon bölgesi olarak tanımlanan bir bölgedir (Sato vd 1995).

CDKN1B, siklin E-CDK2 yada siklin D-CDK4 kompleksine bağlanarak, bu kompleksin aktivasyonunu engeller. Yani hücre döngüsü progresyonunun G1 evresinde kontrolünü sağlar. CDKN1B'nin translasyonu G1'in erken evresinde maksimuma ulaşmaktadır. Temel fonksiyonu hücre döngüsünü durdurmak yada yavaşlatmak olduğu için 'Hücre döngüsü inhibitörü' olarak ifade edilir (Roy A vd 2015). Ayrıca, CDKN1B'nin aşırı ekspresyonunun CDK aktivasyonunu ve hücre döngüsünün S fazına girmesini

engellediği de rapor edilmiştir (Polyak vd 1994, Toyoshima vd 1994). *CDKN1B* sadece hücre döngüsü ilerlemesinin bir ana düzenleyicisi olarak ortaya çıkmamıştır, aynı zamanda birçok malignitede de rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca *CDKN1B*, hücre sağkalımını ve apoptozu da düzenlemektedir fakat etkileri ortam koşullarına oldukça bağımlıdır. Farklı çalışmalarda, *CDKN1B*'nin endotelial ve fibroblast hücrelerinde *CDK2* aktivitesini düşürerek apoptozisi negatif yönde regüle ettiği gösterilmiştir (Levkau vd 1998, Hiromura vd 1999). Aynı zamanda, *CDKN1B*'nin özellikle solid tümörlerde apoptozisi uyardığı da rapor edilmiştir (Katayose vd 1997, Fujieda vd 1999, Eguchi vd 2004). Kanser hücrelerinde *CDKN1B* inaktivasyonu genellikle RTK, PI3K, SRC yada MAPK yolaklarının onkogenik aktivasyonu ile gerçekleşir. Bunlar *CDKN1B*'nin proteolizini hızlandırır ve kanser hücresinin kontrolsüz bir şekilde hızlı çoğalmasına yol açarlar. *CDKN1B*, Src tarafından tirozin 74 yada 88 bölgesinden fosforillendiğinde siklin E-cdk2 inhibisyonunu durdurur. Ayrıca Src'nin *CDKN1B* proteininin hem yarı ömrünü azalttığı hem de daha hızlı degrade olmasına yol açtığı da gösterilmiştir. Bu KIP ailesi üyelerinin mutasyonel inaktivasyonlarına çok nadir olarak rastlanılmaktadır (Deschénes vd 2001, Bastians vd 1998). *CDKN1B* genel anlamda bir tümör baskılayıcı olarak kabul edilmesine rağmen, son araştırmalar *CDKN1B*'nin onkogenik özelliğinin de olabileceğini göstermektedir. Min ve arkadaşları sitoplazmik *CDKN1B*'nin AML'de kötü prognozla ilişkili olduğunu göstermişlerdir (Min vd 2004). *CDKN1B* uzun bir süre boyunca sadece bir hücre döngüsü düzenleyicisi olarak düşünülmesi dolayısıyla lösemi, lenfoma ve diğer malignitelerdeki işlevi klasik olarak tümör baskılayıcı özelliklerine dayandırılmıştır. Artık son yıllarda, *CDKN1B* hem bir tümör baskılayıcı hem de potansiyel bir onkogen olarak tanımlanmaktadır (Roy ve Banerjee 2015).

Diğer bir CDKI ailesi olan *INK4* üyelerinden *CDKN2A* ise 9. kromozomun p21.3 bölgesinde lokalizedir (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene). Paylaşılan kodlama bölgelerinin ve alternatif okuma çerçevelerinin kullanımıyla *CDKN2A* geni 2 ana protein kodlar. Bunlar bir siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p16 (*INK4*) ve p53 stabilize edici protein *MDM2*'yi bağlayan p14 (*ARF*)'tür (Robertson ve Jones, 1999). Stott ve arkadaşları (1998), *CDKN2A*'nın alfa transkriptinin *CDK4* ve *CDK6* tarafından Rb proteininin fosforilasyonunu inhibe ederek hücre döngüsünü G1 evresinde engelleyen bir tümör baskılayıcı olan p16'yı (*INK4a*) kodladığını rapor etmişlerdir. *CDKN2A*'nın beta transkriptinin ise p53 yolunu düzenleyen p14'ü (*ARF*) kodladığı belirlenmiştir. Yani *CDKN2A* geni, iki kritik hücre döngüsü düzenleyici yolu olan p53 ve RB1 yolunu düzenleyen proteinleri kodlamaktadır. *CDK4* ve *CDK6*'ya bağlanan önemli bir hücre döngüsü düzenleyicisidir ve bu proteinlerin Rb proteinini fosforilleme yeteneklerini inhibe eder (Coppé JP vd 2011). Hücrede *CDKN2A* miktarındaki azalış, hücre döngüsünün G1 ile S fazı arasındaki kontrol noktasını bloke ederek, proliferasyon artışına neden

olmaktadır. Bu gen sıklıkla birçok tümör çeşitinde mutasyona veya delesyona uğramıştır (<http://www.cancerindex.org/geneweb/CDKN2A.htm>).

INK4 ailesinin bir diğer üyesi olan *CDKN2B*, p15INK4B proteinini kodlamaktadır. *CDKN2B* geni, birçok tümör çeşitinde sıklıkla mutasyona ve delesyona uğramış bir bölgede *CDKN2A*'ya bitişik olarak yer almaktadır. Bu gen, CDK4 veya CDK6 ile bir kompleks oluşturan ve CDK kinazların aktivasyonunu önleyen bir siklin bağımlı kinaz inhibitörünü kodlamaktadır. Siklin-D aracılı CDK kinaz aktivasyonunu engeller. Yani bir hücre gelişimi regülatör proteini olan *CDKN2B*, hücre döngüsünün G1 progresyonunu kontrol eden bir hücre büyüme düzenleyicisi olarak işlev görmektedir (Wolff vd 2013). Bu genin ekspresyonunun TGF- β tarafından önemli ölçüde indüklenmesi, TGF- β 'nın uyardığı büyüme inhibisyonunda rolü olduğunu göstermektedir. Bu genin iki alternatif transkript varyanty tanımlanmıştır ve bu iki varyant farklı proteinleri kodlamaktadır (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1030>). Hem *CDKN2B*'nin hem de *CDKN2A*'nın inaktivasyonu, Rb fosforilasyonu için gereklidir. Kanserde *CDKN2B* ve *CDKN2A*'nın delesyonuna sıklıkla rastlanmaktadır (Beroukhi ve 2010, Bignell vd 2010).

Hücre döngüsü regülatör molekülleri, lenfomaların oluşumu ve progresyonu ile oldukça yakından ilişkilidir. Özellikle DBBHL ve Burkitt lenfoma gibi daha agresif lenfomaların hücre döngüsü regülatörlerindeki değişimler nedeniyle, daha yüksek proliferatif indekse sahip oldukları bilinmektedir (Sánchez-Beato vd 2003). Hücre döngüsü inhibitörleri olarak fonksiyon yapan genlerde de lenfomagenезle ilişkili olarak genetik değişimler tanımlanmıştır (Güney vd 2012, Laharanne vd 2010). Bu genetik değişimler DBBHL'da nadir görülen değişimler olarak yer almaktadır (Güney vd 2012, Chonabayashi vd 2014). Bilgilerimiz dahilinde literatürde DBBHL'da *CDKN1A* ve *CDKN1B*'de tanımlanan bir genetik değişime rastlanmamıştır. Güney ve ark., DBBHL olgularının yaklaşık %5'inde *CDKN2A*'da ve %6'sında *CDKN2B*'de genetik değişimler tanımlamışlardır (Güney vd 2012). Aynı çalışmada söz konusu genlerde gözlenen metilasyon oranları ise sırası ile %37 ve %31 olarak belirtilmiştir. Amara ve ark., DBBHL olgularında metilasyon-spesifik PCR ile *CDKN2A* ve *CDKN2B* promoter metilasyon oranlarını sırası ile %52 ve %41 olarak rapor etmişlerdir (Amara vd 2008). Aynı zamanda, *CDKN2A* promoter metilasyonunun DBBHL olgularında kötü prognozla ilişkili olduğu ve sağkalım üzerinde negatif etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Zainuddin vd 2011).

2.8. Eksozomlar

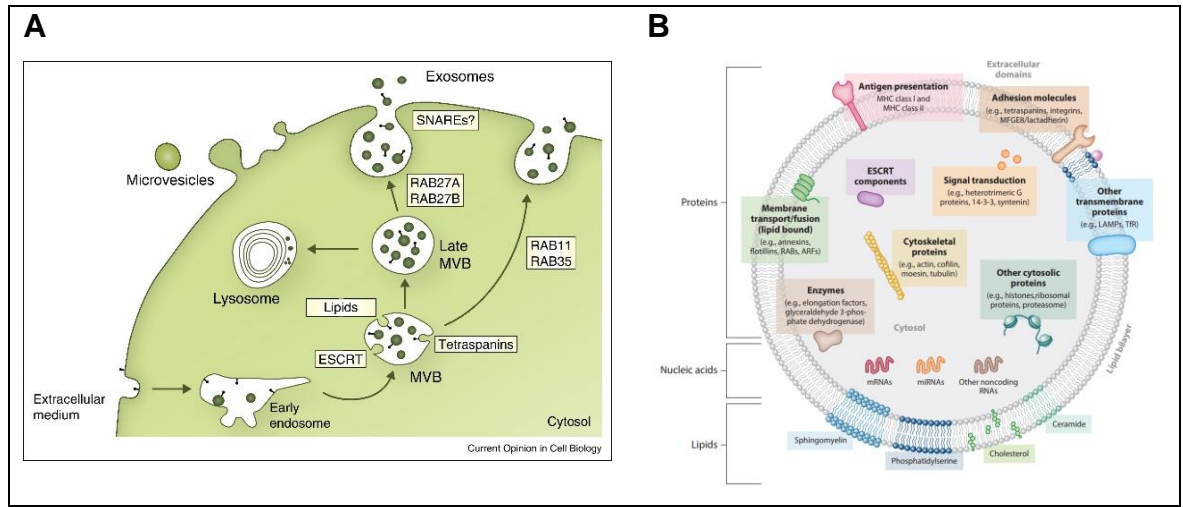
2.8.1. Eksozom biyogenezi

Hücreler, ekstraselüler vezikül (EV)'ler aracılığı ile komşu hücrelerle veya uzakta bulunan hücrelerle iletişim halindedirler. Bu veziküllerin orijini, biyogenezi, büyüklükleri ve özellikleri birbirlerinden farklıdır ve literatürde farklı isimlendirmeler altında kullanılmaktadır. Henüz isimlendirme için uluslararası kabul görmüş kriterler bulunmamakla birlikte, büyüklüklerine (mikroveziküller, nanoveziküller), orijin aldığı hücre veya doku tipine (onkozomlar), tahmin edilen biyolojik fonksiyonlarına (kalsifiye edici matriks vezikülleri) veya hücre dışında bulunmalarına göre (eksozomlar) adlandırılmaktadırlar (Colombo vd 2014). EV'lerin izolasyon aşamalarındaki teknolojik ilerlemelere göre adlandırmaların da güncelleneceği son derece açık olmakla birlikte, günümüzde literatürde EV'ler sıklıkla büyüklüklerine göre adlandırılmaktadırlar. Buna göre EV'ler apoptotik cisimler (1000-5000 nm), intermediate-büyüklükte mikroveziküller (MV'ler, 200-1000 nm) ve en küçük veziküller de eksozomlar (30-150 nm) olarak adlandırılmaktadır.

Eksozomlar, 50-100 nm çapında ve endositik orijinli membranla çevrili veziküllerdir. Epitel hücreleri, B-hücreleri, retikülositler ve tümör hücreleri gibi birçok farklı hücre tipi tarafından ekstraselüler alana salınırlar. Günümüzde hastalıklarla ilişkili olarak eksozomların kan plazması, idrar, süt, bronkoalveolar lavaj örnekleri, amniyon sıvısı ve malign efüzyonlar gibi vücut sıvılarında buldukları bilinmektedir (Tkach ve Théry 2016). Eksozom oluşumu, hücre yüzeyinde proteinlerin endositozu ile başlar (Şekil 2.9-A). Bu süreç kltrin-bağımlı (örn; transferrin reseptörü) veya kltrin-bağımsız (örn; glikozilfosfatidilinositol-anchored proteinler) olabilir. Bu endositik veziküller erken endozomlara dönüşürler. Erken endozomların ligandları hafif asidik pH'da housekeeping reseptörlerinden ayrılarak ya plazma membranına geri dönerler ya da diğer proteinlerle birlikte geç endozomda yer alırlar. Geç endozomlarda pH asidiktir (5.0-5.5) ve geç endozomlar daha yuvarlak şekillidirler. Geç endozomda proteinler, membranın tomurcuklanması ile oluşan intraluminal veziküllere yerleşirler ve sonuçta multiveziküler cisim (MVB) oluşur. MVB'ler ya protein degradasyonu için lizozomlarla birleşirler ya da plazma membranı ile füzyon yaparlar ve eksozomlar olarak ekstraselüler alanda serbest kalırlar. Bir başka ifade ile ekstraselüler alana salınan intraluminal veziküller eksozomlar olarak adlandırılırlar (Kowal vd 2014). Dolayısıyla eksozom oluşumu iki dahili tomurcuklanma mekanizması içerdiğinden, köken aldığı hücrenin topolojik oriyantasyonunu korur (dışarıda membran proteinleri ve içeride sitozol benzeri yapılanma) (Şekil 2.9-B).

2.8.2. Eksozom içeriği

Eksozomlar, ilk kez 1980'lerde Stahl ve Johnstone'in çalışmaları sonucunda retikülositlerden salınan 50 nm'lik veziküller olarak tanımlanmışlar ve birçok hücrel atığın elden çıkarılma mekanizmalarından biri olarak değerlendirilmişlerdir. Eksozomların "hücrel çöp toplayıcı" imajının "bilgi taşıyan veziküller" olarak değişmesi onlarca yıl almıştır. Günümüzde eksozomlar, içerdikleri makromoleküller (protein, nükleik asitler, lipidler) sayesinde hücreler arasında bilgi transferini sağlayan son derece donanımlı veziküller olarak büyük öneme sahiptirler. Eksozomlar hücrel etkileşimlerdeki bu kritik önemleri nedeniyle de sağlıkta ve hastalıkta farklı hücrel mekanizmaları yönlendirirler.



Şekil 2.9. (A) Eksozom biyogenez basamakları, **(B)** Eksozom yapısı ve eksozomal içerik

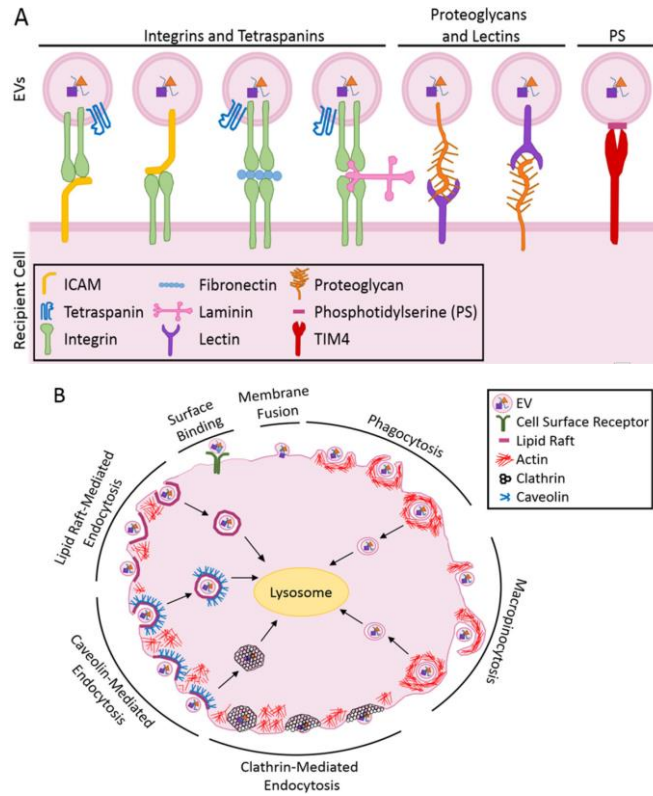
Eksozomların içerdikleri ortak protein aileleri şaperonlar (HSP70 ve HSP90), hücre iskeleti proteinleri (aktin, tübülün gibi), transport ve füzyonda yer alan proteinler (Rab11, Rab2 ve anneksinler gibi), tetraspanin proteinler (CD9, CD63, CD81 ve CD82) ve ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) proteinleri (TSG101 gibi)'dir. Bu proteinlerin yanısıra her bir eksozom köken aldığı hücreye özgün proteinleri de içerir (Colombo vd 2014, Whiteside 2016). Eksozomlar aynı zamanda DNA, mRNA ve kodlama yapmayan RNA (snRNA, piRNA, snoRNA, snRNA gibi) moleküllerini de içerirler ve özellikle hücre dışına çıkan nükleik asitlerin eksozom lipid zarı tarafından korunduğuna dair veriler artmaktadır (Kalluri ve LeBleu 2016, Bortoluzzi vd 2017). Bu sonuçlar bize eksozomal içeriğin hastalıkların izlenmesinde biyobelirteçler olarak kullanılabileceklerini ve kan plazması, idrar, süt, bronkoalveolar lavaj örnekleri gibi tüm vücut sıvılarında bulunabildiklerinden "sıvı biyopsi" materyalleri olarak değerlendirilebileceklerini göstermektedir.

Yapılan çalışmalar eksozom içerisine alınacak biyomoleküllerin spesifik bir seçim ile gerçekleştiğini göstermektedir. Biyomoleküllerin tiplerine göre, eksozom içine alınmalarından sorumlu mekanizmalar da farklılıklar göstermektedir. Konu ile ilgili en detaylı çalışmalar proteinlerin eksozom içine paketlenmesi ile ilişkilidir. Proteinlerin eksozom içeriğine dahil edilmesinden sorumlu en az 2 mekanizma tanımlanmıştır. Bunlardan ilki ESCRT-bağımlı mekanizmadır ve vezikül içine ubikutinlenmiş proteinlerin alımı ile başlar. Ubikutinlenmiş proteinler ESCRT-0 tarafından tanınırlar ve ardından ESCRT-1 ve ESCRT-2'nin bağlanması gerçekleşir. Alix proteinleri, bu yapının sabitlenmesinden sorumludur. Sabitlenen bu yapılar sonras ve vezikül tomurcuklanır ve ESCRT-3 bu vezikülün membrandan ayrılmasını sağlar (Henne vd 2011). Diğer mekanizma ESCRT-bağımsız mekanizmadır. Mekanizma ile ilgili detaylı veriler henüz tanımlanma aşamasındadır, ancak tetraspanin/lipid'lerin bu mekanizmada yer aldıkları bilinmektedir. Tetraspaninler integral membran proteinlerdir ve eksozomlar tetraspaninlerden oldukça zengin yapılardır. Diğer transmembran proteinleri, sitozolik proteinler ve lipidlerle etkileşime geçtiklerinde, tetraspaninler membranı yeniden organize ederler ve membranda tetraspaninden zengin bölgelerin oluşumuna neden olurlar. Bir tetraspanin olan CD81 molekülü, hem membranla fiziksel organizasyonda hem de sitozolik domaini aracılığıyla hücre içeriği ile etkileşime girerek eksozom oluşumunda anahtar rol oynamaktadır (Perez-Hernandez vd 2013).

Lipid moleküllerinden seramidin spontan olarak endosomal membranın kıvrılmasından sorumlu olduğu bilinmesine karşın, henüz vezikülün selektif olarak hangi molekülü nasıl paketlediği ile ilgili mekanizma henüz bilinmemektedir. Yukarıda tanımlanan iki farklı mekanizmanın varlığına karşın, eksozomların her iki mekanizmayı da kullanarak proteinleri ve lipidleri vezikül içine paketledikleri bilinmektedir ki, bu durum bize eksozomların makromoleküllerin paketlenmesi açısından heterojen olduklarını göstermektedir (Villarroya-Beltri vd 2014).

Eksozomlarla ilgili mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamış bir diğer konu da eksozomların hangi hücreleri hedef hücre olarak seçtikleri ve vezikül içeriğinin bu hedef hücreler tarafından nasıl internalize edildiğidir. Tümör kökenli eksozomların endotelial hücreler, epitel hücreleri, fibroblastlar, kemik iliği myeloid prekürsörleri, mezenkimal kök hücreler ve diğer tümör hücreleri tarafından alındığını rapor eden çalışmalar bulunmaktadır (Whiteside 2016). Ancak, eksozomların periferik kan hücre popülasyonları tarafından kabul edildiklerine dair sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bununla birlikte lenfoma özelinde sadece 2 çalışma yer almaktadır. Bu çalışmalardan biri 2015 yılında tamamlanmıştır. Sağlıklı gönüllü bireylerden ve lenfoma hastalarından izole edilen B-hücrelerinin Mantle hücreli lenfoma-kökenli eksozomları etkin biçimde

internalize ettikleri belirlenmiştir. Oysa, sağlıklı bireylerden ve lenfoma hastalarından izole edilen T ve NK hücrelerinin eksozomları internalize etmedikleri/çok zor internalize ettikleri gözlenmiştir (Hazan-Halevy vd 2015). Diğer çalışma 2017 yılında tamamlanmış ve DBBHL hücre hatlarından izole edilen eksozomların sağlıklı B-hücreleri tarafından internalizasyonlarının hem çok hızlı olduğu hem de yüksek miktarda eksozom içerdiği belirlenmiştir. NK, monosit ve T-hücrelerinde ise eksozomların hücre içerisine alınmasının son derece düşük düzeyde olduğu gözlenmiştir (Bennit vd 2017). Özetle, eksozomların tercihli olarak alıcı hücrelerle etkileşimi, eksozomların belli hücre serilerini etkilediklerini düşündürmektedir. Bu özgünlüğün bir kısmı, eksozomların içerdikleri protein yapıdaki yüzey reseptörleri ve adezyon molekülleri ile açıklanabilir (Şekil 2.10-A). Eksozomlar direkt membran füzyonu ve endositoz olmak üzere 2 temel mekanizma ile hedef hücre tarafından internalize edilirler (Şekil 2.10-B). En iyi bilinen EV internalizasyon mekanizması olan endositozdur ve eksozomların pasif membran füzyonunun aksine, daha sıklıkla endositoz aracılığı ile internalize edildikleri düşünülmektedir (French vd 2017).



Şekil 2.10. Eksozomların alıcı hücrelerle etkileşimi **(A)** EV'ler farklı adezyon proteinleri (tetraspaninler, integrinler, ECM proteinleri ve proteoglikanlar) ve lipidler aracılığı ile alıcı hücrenin yüzeylerine bağlanırlar. **(B)** EV'ler alıcı hücre tarafından hücre yüzeyine bağlanma, membran füzyonu, fagositoz, makropinositoz, endositoz (klatrin, kaveolin, lipid raft aracılı) mekanizmaları ile internalize edilirler.

2.8.3. Tumor-kökenli eksozomlar

Eksozomların içerdikleri moleküller aracılığı ile hücreler arası iletişimde rol oynamaları, son yıllarda tumor-kökenli eksozomların yaygın bir şekilde araştırılmaya başlanmasına öncülük etmiştir. Tumor-kökenli eksozomların özellikle tetraspaninlerden, MHC sınıf I moleküllerinden ve ısı şok proteinlerinden oldukça zengin oldukları belirlenmiştir (Lötvall vd 2014). Tumor-kökenli eksozomlarla ilgili çalışmaların bir bölümü eksozomların yapısal özelliklerinin karakterizasyonuna odaklanırken, diğer çalışmalar eksozomların hücreler arası iletişimdeki rolüne odaklanmıştır. Ekstraselüler alana salınımları, eksozomların aynı zamanda kan ve idrar gibi vücut sıvılarında da araştırılabileceği olanağını sunmuştur. Over kanserleri ile ilgili yapılan bir çalışmada, sirkülasyonda bulunan tumor-kökenli eksozomlarının miRNA ekspresyon profillerinin, biyopsi örneklerindeki miRNA profilleri için aday tanı belirteçleri olarak kullanılabilirliklerini ve aynı zamanda asemptomatik bireylerin taramalarında potansiyel kullanımlarının oldukları gösterilmiştir (Taylor ve Gerce-Taylor 2008). Benzer çalışmalarla, kanserli bireylerin kan örneklerinden izole edilen eksozomların, kanser türüne özgün biyolojik belirteçleri taşıdıklarını gösterilmiştir (Thakur vd 2014, Kalishwaralal vd 2018). Bu sayede tumor hücrelerinden sirkülasyona salınan eksozomlar, primer tümörlerin genetik ve/veya epigenetik durumu için uygun bir pencere sunabilir niteliktedir.

Tumor-kökenli eksozomlar; alıcı hücrelerde kanser hücresi proliferasyonu, sağkalımı, progresyonu ve tedaviye direncini arttırabilen sinyal iletim yollarının aktivasyonu ile sonuçlanan fenotipik ve moleküler mekanizmalara neden olurlar (Whiteside 2016, Latifkar vd 2018). Örneğin tumor-kökenli eksozomlar, anjiyogenezini destekleyecek ve tumor hücrelerinin immun sistemden kaçışlarına yardım edecek şekilde tumor mikroçevresini yeniden düzenlerler ve böylelikle tumor progresyonuna katılırlar. DBBHL'da tumor-kökenli eksozomlarla ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan ilkinde, DBBHL'da tumor hücrelerinin eksozom aracılığı ile komşu hücrelere hücre proliferasyonundan sorumlu Wnt3a mRNA'sını transfer ettikleri ve böylelikle tumor mikroçevresindeki hücre populasyon dengesini düzenledikleri gösterilmiştir (Koch vd 2014). Tumor-kökenli eksozomlar aynı zamanda, alıcı hedef hücrelerde epigenetik yeniden programlanmayı düzenleyen biyomolekülleri de içerirler. Bu içerdikleri biyomoleküller aracılığı ile hedef hücrelerde DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve kodlamaya yapmayan RNA regülasyonu gibi çeşitli epigenetik mekanizmaları düzenlerler (Zhongrun vd 2015).

2.9. Hipotezler

Yukarıda verilen literatür bilgileri eşliğinde doktora tez çalışmasının hipotezleri:

1. DBBHL hastalarının plazma ekzozom konsantrasyonu, sağlıklı gönüllü bireylerin ekzozom konsantrasyonundan daha yüksektir.
2. DBBHL hastalarının plazma örneklerinden izole edilen ekzozomlar DNA içerirler.
3. DBBHL hastalarının ekzozomal DNA metilasyon paterni, primer tümör DNA metilasyon paternini yansıtır.
4. DBBHL hastalarının ekzozomal RNA içeriği, primer tümör RNA içeriğini yansıtır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1.Çalışma Grubu

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Polikliniği'ne başvuran ve ilk kez DBBHL tanısı alan 21 hasta, çalışmaya aşağıda belirtilen kriterler dikkate alınarak dahil edildi. DBBHL tanısı alan hastalardan EDTA'lı tüplere (Vacutainer K2EDTA'lı tüp, BD) 10'ar ml periferik kan örneği alındı. Aynı zamanda, bu hastalardan patolojik olarak DBBHL tanısı aldıkları tümör dokularına ait %10 formaldehit solüsyonu ile tespit edilen ve sonrasında parafin bloklara gömülü (FFPE) bloklarından seri kesitler alındı.

DBBHL hastalarına ait çalışmaya dahil edilme kriterleri:

- a) Klinik değerlendirmeyi takiben patolojik incelemeler sonucunda hastalığın tanısını almak (Dünya Sağlık Örgütü'nün belirlediği kriterlere göre),
 - b) *De novo* DBBHL tanısı almak,
 - c) 18-75 yaş arasında olmak,
 - d) Enfeksiyöz ajanlar (HIV, EBV) açısından negatif olmak,
 - e) Daha önce sitotoksik bir ilaç tedavisi almamış olmak.

Çalışmaya dahil edilen DBBHL olgularının immunofenotip alt grupları Tıbbi Patoloji AD'nda ilgili öğretim üyesi tarafından belirlendi. DBBHL'nın moleküler alt gruplarını yansıtabilecek şekilde immunofenotiplerinin belirlenmesinde Hans ve arkadaşlarının tanımladığı algoritma kullanıldı (Hans vd 2004). Bu amaçla FFPE doku örneklerinden 5 µm kalınlığında kesitler alınıp elektrostatik yüklü, poli-L-lizin kaplı lamalara yerleştirildi. Doku kesitleri 60°C'de en az 2 saat dehidre edildi. Deparafinizasyon ve antijen retrieval işlemlerini içeren immunohistokimyasal prosedürler için otomatize sistem kullanıldı (Ventana Medical Systems). Analiz aşamalarında reaktif lenf nodülleri ve normal timik doku örnekleri pozitif kontrol olarak kullanıldı. Primer antikorun eklenmediği ve aynı immunohistokimyasal protokolün uygulandığı preparatlar ise negatif kontrol olarak değerlendirildi. İmmunohistokimyasal analizde, ışık mikroskopunda 40x büyütmede immunopozitif hücreleri içeren en az 10 alan değerlendirildi. İmmunopozitif hücrelerin sayısı, sayılan toplam hücre sayısına bölünerek ve neoplastik hücrelerin en az %25'inde immunopozitiflik görülmesi durumunda "ekspresyon pozitif" olarak değerlendirildi.

DBBHL olgu grubunu oluşturan hastaların yaş ortalaması ile benzer yaş olacak şekilde 21 gönüllü sağlıklı bireylerden, aşağıda belirtilen kriterler dikkate alınarak kontrol grubu oluşturuldu. DBBHL için literatürde cinsiyet farklılığı tanımlanmadığından, kontrol grubunun oluşturulmasında cinsiyet faktörü göz önüne alınmadı. Kontrol grubunu

oluşturan bireylerden EDTA'lı tüplere (Vacutainer K2EDTA'lı tüp, BD) 10'ar ml periferik kan örneği alındı.

Kontrol grubunu oluşturan bireylere ait çalışmaya dahil edilme kriterleri:

- a) Herhangi bir malignite öyküsü bulunmamak,
- b) 18-75 yaş arasında olmak,
- c) Herhangi bir kronik hastalık öyküsü (diyabetes mellitus, kronik karaciğer hastalığı gibi) ve otoimmün hastalık öyküsü bulunmamak,
- d) Organ fonksiyonları açısından stabil olmak,
- e) Daha önce sitotoksik bir ilaç tedavisi almamış olmaktır.

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Komisyonu'ndan onay alındıktan sonra (08/03/2016 tarih - 05 sayılı kurul toplantısı), çalışma grubuna ait klinik örneklerin alınımına başlanmıştır.

3.2. Plazma Örneklerinden Eksozom İzolasyonu

Çalışma grubunu oluşturan DBBHL hastaları ve sağlıklı gönüllü bireylerden periferik kan örnekleri alındıktan sonra, en kısa sürede eksozom izolasyonuna başlandı. Eksozom izolasyonu ultrasantrifüj-tabanlı protokol uygulanarak 2 basamakta gerçekleştirildi (Caner vd 2016): İlk basamakta, platelet-free plazma örneğinin eldesi hedeflendi ve bu amaçla 2 kez ardışık olarak 2.500 x g'de 15 dk santrifüj işlemleri gerçekleştirildi. İkinci basamakta, 12.000 x g'de 45 dk santrifüj sonrasında örnekler, 0.2 µm por çaplı filtreden geçirildi ve 110.000 x g'de 2 saat ve 1 saat olmak üzere ardışık 2 farklı ultrasantrifüj işlemi uygulandı (Optima Max-XP, Beckman Coulter). Ultrasantrifüj sonrasında, elde edilen pelet PBS'te süspansiyon edildi ve 50 µl örnek aynı gün içinde morfolojik analiz için PAÜ Elektron Mikroskopu Birimi'ne iletildi. Geride kalan örnekler sonraki analizlerde (Western blot analizi, mutasyon analizi, metilasyon-spesifik PCR ve mRNA ekspresyon profillerinin belirlenmesi) kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.

3.3. İzole Edilen Eksozomların Karakterizasyonu

3.3.1. Morfolojik Karakterizasyon

Eksozomların morfolojik karakterizasyonlarını belirlemek için 2 farklı yöntem uygulandı:

3.3.1.1. Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskobu (STEM-Scanning Transmission Electron Microscope) Yöntemi:

- PBS içindeki eksozom pelletinden 5 µl alınarak formvar kaplı nikel gridlere absorbe edildikten sonra 20 dk inkübe edildi.
- PBS (pH 7,4) ile yıkanan gridler, %2'lik paraformaldehit ile 10 dakika fikse edildikten ve PBS ile yıkandıktan sonra, %1'lik glutaraldehit ile 5 dakika fikse edildi.
- PBS ile yıkanan gridler (7x2 dk), %2'lik Uranil Asetat (sulu) ile 15 dakika kontrastlandıktan sonra 3-5 kez tri-distile su ile yıkandı.
- Kurutulan gridler, Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskobu dedektörü (STEM) içeren Alan Emisyon Taramalı Elektron Mikroskobu'nda (FESEM-Carl Zeiss, Supra 40 VP) incelendi ve mikrografları alındı.

3.3.1.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM-Scanning Electron Microscope) Yöntemi:

- PBS içindeki eksozom pelleti Poly-L lizin kaplı yuvarlak lamellere damlatıldıktan ve oda sıcaklığında 40 dakika bekletildikten sonra, %2,5'lük glutaraldehit ve %4'lük paraformaldehit (PBS'de) ile 5 dakika fikse edildi.
- Distile su ile yıkanan lameller, gece boyunca kurumaya bırakıldıktan sonra stamlara yerleştirildi ve Au-Pd ile kaplandı.
- Lameller Emisyon Taramalı Elektron Mikroskobu'nda (FESEM-Carl Zeiss, Supra 40 VP) incelenerek mikrografları alındı.

3.3.2. Eksozomal total protein konsantrasyonunun belirlenmesi

İzole edilen eksozom örneklerinden protein lizatları hazırlandı. Bu amaçla, öncelikle aşağıda belirtildiği şekilde lizis çalışma tamponu hazırlandı ve protokol uygulandı:

- 1x lizis tamponuna (Cell Signalling Tech.), 1µl proteaz inhibitör kokteyli (100x) (Cell Signalling Tech.) ve 1 µl EDTA (0.5 M) eklenerek toplamda 100 µl çalışma lizis tamponu elde edildi.
- 100 µl çalışma lizis tamponuna 100 µl eksozom örneği eklendi ve homojenize edildi. Örnekler 15 dk buzda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tekrar vortekslenerek eksozomal protein lizatları hazırlandı. Bu lizatlar; eksozomların total protein konsantrasyonlarının belirlenmesinde, eksozomal proteinlerin Coomassie Blue ile görüntülenmesinde ve Western Blot analizlerinde kullanıldı.

Eksozomların total protein konsantrasyonları Bradford yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla ticari bir kit (DC Protein Assay, BioRad) ve ticari protein standardı (Protein Standard II, BSA, BioRad) kullanıldı. Uygulanan protokol aşağıda özetlendi:

- Protein standartları kullanılarak 0,008-1,29 mg/ml konsantrasyonlarda olmak üzere 5 farklı standart hazırlandı.
- Herbir standardın ve eksozomal protein lizat örneklerinin üzerine, kitle birlikte sağlanan çalışma solusyonu eklendi ve homojenize edildi.
- Homojenatların üzerine kitle birlikte sağlanan bir diğer solüsyon (Reagent B) eklendi ve 15 dk inkübasyondan sonra 705 nm'de (BioTek, ELx808) okuma yapıldı.
- İzole edilen eksozomlardaki total protein miktarları, standart eğri baz alınarak hesaplandı.

Eksozomal proteinlerin Coomassie Blue ile görüntülenmesi amacıyla uygulanan protokol aşağıda özetlendi (Taylor ve Gerçel-Taylor 2005, Lee vd 2013):

- 30 µl lizat örneğine 10 µl Western Blot yükleme boyası (4x) (Thermo Sci.) eklendi ve 95°C'de 5 dk inkübe edildi. Sonrasında protein örnekleri 90 V'da SDS-PAGE jelde yürütüldü (BioRad).
- Jel örnekleri Coomassie blue (Sigma), metanol (Merck) ve glacial asetik asit (Merck) içeren boyama solüsyonuna aktarıldı ve 4 saat inkübe edildi.
- Inkübasyon sonrası, jel örnekleri metanol ve glacial asetik asit içeren destaining solüsyonunda 16 saat inkübasyona bırakıldı.
- Inkübasyon sonrası jel görüntüleri alındı.

3.3.3. Eksozomlarda CD63, CD81 (TAPA1) ve TSG101 yüzey belirteçlerinin belirlenmesi

Eksozomal yüzey belirteçlerinin varlığı için yapılacak Western Blot analizleri için ayrılan eksozomal protein lizat örneklerine de 10 µl Western Blot yükleme boyası eklendi ve 95°C'de 5 dk inkübe edildi. Inkübasyon sonrası anti-CD63 (Abcam), anti-CD81 (Abcam), anti-TSG101 (Abcam) ve anti-β aktin (Abcam) primer antikoları ve goat anti-rabbit IgG sekonder antikoru (Abcam) kullanılarak Western Blot analizleri tamamlandı. Bu amaçla uygulanan protokol aşağıda özetlendi:

- %10'luk SDS-PAGE jeli hazırlandı. Jelin kuyularına 20 µl olacak şekilde eksozomal total protein lizat örnekleri ve protein moleküler ağırlık standardı (Prestained Protein Ladder, Santa Cruz Biotech.) yüklendi.
- SDS-PAGE jeller, 1 x SDS running tamponunda yaklaşık 1 saat yürütüldü (BioRad).
- Elektroforez işlemi takiben, jel ve blot membranı (PVDF membran, Immobilon-P, Sigma) içerecek şekilde yeni bir jel kaseti hazırlandı ve 1x transfer tamponunda 100 V'da 90 dk bekletilerek jelde bulunan proteinlerin membrana transferi gerçekleştirildi.

- Membranlar, yağsız süt tozu içeren TBST solüsyonunda yaklaşık 1 saat bekletilerek, bloklandı.
- Üretici firmanın önerdiği konsantrasyonlarda her bir hedef yüzey belirteci için primer antikolar hazırlandı ve membranlar 4°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrası membranlar TBST'de 10 dk (x4) rotatorda yıkandı.
- Yıkama sonrası membranlara sekonder antikor solusyonu (1:10.000 dilüsyonda) eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası membranlar TBST'de 10 dk (x4) rotatorda yıkandı.
- Membranlar, sekonder antikorun taşıdığı HRP'nin kromojenik substratını (DAB) içeren boyama solüsyonunda görüntülendi.

Boyama solüsyonunun hazırlanmasında, öncelikle 200 mM Sodyum Asetat (pH 5.0) (Sigma) içine 0.0334 g DAB (Sigma) eklendi. Üzerine %0.3'lük CoCl (Merck) ve %3'lük H₂O₂ (Merck) eklendi.

3.4. Plazma Örneklerinde Eksozom Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

İzole edilen eksozomların karakterize edilmelerinden sonra, plazma örneklerindeki eksozom konsantrasyonlarının belirlenmesi amacı ile, tüm eksozomlarda var olduğu bilinen esteraz enzim aktivitesine dayalı protokol uygulandı ve bu amaçla ticari kit (Exocet, SBI) kullanıldı. Uygulanan protokol aşağıda özetlendi:

- Kitle birlikte sağlanan standart örneği kullanılarak 20x10⁷-1280x10⁷ aralığında 7 farklı standart örneği hazırlandı.
- Eksozom örneklerine (20 µl) eksozom lizis tamponu (80 µl) eklendi, 37°C'de 5 dk inkübe edildikten sonra 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant örneklerine (50 µl) ve standart örneklerine kitle birlikte sağlanan reaksiyon karışımı eklendi ve 15 dk inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası örneklerin 405 nm dalga boyunda OD değerleri kaydedildi (BioTek, ELx808) ve standart grafiği kullanılarak, plazma örneklerindeki eksozom konsantrasyonları belirlendi.

3.5. DNA İzolasyonu

3.5.1. Eksozom Örneklerinden DNA İzolasyonu

DBBHL hastaları ve sağlıklı gönüllü bireylerin plazma örneklerinden elde edilen eksozomların *EZH2* ve *EZH2*'nin hedef genlerine ait DNA fragmanlarını içerip içermediklerinin belirlenmesi amacıyla, eksozom örneklerinden DNA izolasyonu yapıldı. DNA izolasyonu öncesinde eksternal DNA kontaminasyonunu önlemek amacı ile, eksozom örneklerine DNaz I (Roche Inc.) uygulaması yapıldı. Özetle, 100 µl eksozom örneği (PBS içinde) üzerine üretici firma tarafından sağlanan 10x tampon (10 µl) ve DNaz

I enzimi (1U) eklendi ve 37°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası, enzimin inaktivasyonu için örnekler 75°C'de 10 dk inkübe edildi ve sonrasında DNA izolasyon aşamasına geçildi.

Eksozom örneklerinden DNA izolasyonu QIAamp® DNA Mini Kit(Qiagen) kullanarak gerçekleştirildi. Aşağıda DNA izolasyonu amacı ile uygulanan basamaklar ana hatları ile yer almaktadır:

- 1) Eksozomal örnek üzerine, kitle birlikte sağlanan doku lizis tamponu ve proteinaz K eklendi. Örnek, 56°C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı.
- 2) İnkübasyon sonrası, örnek üzerine %100'lük etanol eklendi ve homojenize edildi.
- 3) Elde edilen homojenat, kitle birlikte sağlanan spin-kolonlara aktarıldı ve santrifüj edildi.
- 4) Santrifüj sonrası sırası ile 2 farklı yıkama tamponu kullanılarak spin-kolonlar yıkandı.
- 5) Yıkama sonrasında, spin-kolonlarda bulunan membranlar kurutuldu ve üzerlerine elusyon tamponu eklendi ve santrifüj edildi.
- 6) Santrifüj sonrası elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflıkları spektrofotometrik olarak ölçüldü ve hesaplandı (Nanodrop, Thermo Sci.).

3.5.2. Eksozomal DNA'nın Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ile Görüntülenmesi

Bilgilerimiz dahilinde literatürde, DBBHL hastaların plazma eksozomlarının DNA içerdiğine dair bilgi bulunmadığından, destekleyici olması amacı ile izole edilen eksozomal DNA'nın AFM ile görüntülenmesi gerçekleştirildi. Bu amaçla, örnek hazırlığı için Memorial Sloan Kettering Cancer Center, USA'dan Dr. A. Barlas ile kişisel görüşmeler yapıldı ve sonrasında protokol belirlendi. Buna göre, mika yüzey üzerine 5 mM Mg⁺² varlığında 50 µl DNA örneği (2 ng/ml) yüklendi. Oda sıcaklığında 3 dk inkübe edildi. Ardından 1 ml ultrapure deiyonize H₂O ile mika yüzey yıkanarak kurumaya bırakıldı. Hazırlanan örnekten AFM ile görüntü alınması için hizmet alımı (NanoMagnetik Bilimsel Cihazlar, Ankara) yapıldı.

3.5.3. FFPE Doku Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu

DBBHL hastalarının FFPE doku örneklerinden DNA izolasyonları ticari kit (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) yardımı ile gerçekleştirildi. Aşağıda DNA izolasyonu amacı ile uygulanan basamaklar, ana hatları ile yer almaktadır:

- 1) Arşiv doku örneklerinden alınan seri kesitlerde, tümör dokusu etrafında bulunan fazla parafin, steril bistüri ve pens yardımı ile mekanik olarak uzaklaştırıldı.

- 2) Doku örneklerinde deparafinizasyon amacı ile ksilen (Sigma-Aldrich) ilave edildi ve homojenize edildi.
- 3) Örnekler 56°C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı.
- 4) İnkübasyon sonrasında doku örnekleri santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- 5) Doku örneklerinde kalan ksileni uzaklaştırmak amacı ile %100 etanol eklendi ve homojenize edildi. Sonrasında santrifüj edilerek, süpernatant uzaklaştırıldı.
- 6) Pelet üzerine kitle birlikte sağlanan doku lizis tamponu ve proteinaz K eklendi. Örnek, 56°C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı.
- 7) Örnekler kitle birlikte sağlanan bir diğer lizis tamponu eklendi ve homojenize edildikten sonra 70°C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı.
- 8) İnkübasyon sonrası, örnek üzerine %100'lük etanol eklendi ve homojenize edildi.
- 9) Elde edilen homojenat, kitle birlikte sağlanan spin-kolonlara aktarıldı ve santrifüj edildi.
- 10) Santrifüj sonrası sırası ile 2 farklı yıkama tamponu kullanılarak spin-kolonlar yıkandı.
- 11) Yıkama sonrasında, spin-kolonlarda bulunan membranlar kurutuldu ve üzerlerine elusyon tamponu eklendi ve santrifüj edildi.
- 12) Santrifüj sonrası elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflıkları spektrofotometrik olarak ölçüldü ve hesaplandı (Nanodrop, Thermo Sci.).

3.6. Bisülfid Uygulaması

Metilasyon-spesifik PCR uygulamasından önce, izole edilen DNA örneklerine bisülfid uygulaması yapıldı. Bu amaçla ticari kit (EZ DNA Methylation-Gold Kit, Zymo Res.) kullanıldı. Aşağıda bu amaçla uygulanan basamaklar, ana hatları ile yer almaktadır:

- 1) Kitle birlikte liyofilize halde sağlanan dönüşüm reagenti, üretici firmanın belirttiği şekilde hazırlandı.
- 2) Toplam 20 µl DNA örneği (DNA konsantrasyonu 60-120 ng) üzerine 130 µl dönüşüm reagenti eklendi ve örnekler thermal cycler'da (Nyx Teknik, Inc. USA) önce 98°C'de 10 dk ve sonrasında 64°C'de 2.5 saat inkübe edildi.
- 3) İnkübasyon sonrası örnekler, kitle birlikte sağlanan ve üzerlerine 600 µl bağlanma tamponu eklenen spin-kolonlara aktarıldı.
- 4) Örnekler 14.000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, spin-kolonlara 100 µl yıkama tamponu eklendi ve 14.000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi.
- 5) Santrifüj sonrası, spin-kolonlara 200 µl desülfonasyon tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 15-20 dk inkübe edildi.

- 6) Spin-kolonlar bir kez daha yıkama tamponu kullanılarak yıkandı ve sonrasında 10 µl elüsyon tamponu eklenerek, bisüfit uygulaması yapılan DNA örnekleri elde edildi.

3.7. Metilasyon-Spesifik PCR (MSP)

Kuramsal bilgiler bölümünde tartıştığımız üzere, DBBHL'da *EZH2* ekspresyonunun var olduğu bilinmektedir ve literatürde bilgilerimiz dahilinde DBBHL'da *EZH2*'de DNA metilasyonunun varlığını bildiren bir çalışma da bulunmamakla birlikte *EZH2*'nin hedef genlerinin promoter bölgelerinde DNA metilasyonunun varlığı tanımlanmıştır (De vd 2013). Bu nedenlerle, çalışmamızda sadece *EZH2*'nin hedef genlerinde metilasyon paternleri araştırıldı. Bisüfit uygulaması tamamlanan DNA örnekleri ve hedef genlerin (*CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN2A* ve *CDKN2B*) promoter bölgelerine özgün metile ve unmetile primer setleri kullanılarak metilasyona-spesifik PCR gerçekleştirildi (Applied Biosystem). Hedef genler için kullanılan primer setleri Tablo 3.1'de özetlendi.

Tablo 3.1. Hedef genlere özgün MSP için metile ve unmetile primer setleri

Hedef Gen	Baz dizisi (5'→3')	Büyük ük (bp)	Referans
<i>CDKN1A</i>			
Metile-forward	GTTGTTTGTGGAATTCGGTTAG	230	Watanabe vd 2010
Metile-reverse	CGACGAATCCGCGCC		
Unmetile-forward	GTTTGTGGAATTTGGTTAG	230	
Unmetile- reverse	CAACAAATCCACACCCAA		
<i>CDKN1B</i>			
Metile-forward	AAGAGGCGAGTTAGCGT	195	Park vd 2001
Metile-reverse	AAAACGCCGCCGAACGA		
Unmetile-forward	ATGGAAGAGGTGAGTTAGT	212	
Unmetile-reverse	AAAACCCCAATTA AAAACA		
<i>CDKN2A</i>			
Metile-forward	TTATTAGAGGGTGGGGGGGATCGC	234	Psofaki vd 2010
Metile-reverse	CCACCTAAATCGACCTCCGACCG		
Unmetile-forward	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	234	
Unmetile-reverse	CCACCTAAATCAACCTCCAACCA		
<i>CDKN2B</i>			
Metile-forward	GCGTTCGTATTTTGC GGTT	154	Shiozawa vd 2006
Metile-reverse	CGTACAATAACCGAACGACCGA		
Unmetile-forward	TGTGATGTGTTTGTATTTTGTGGTT	154	
Unmetile-reverse	CCATACAATAACCAACAACCAA		

Her hedef gen için Tablo 3.2'de yer alan reaksiyon karışımı hazırlandı ve sonrasında özgün MSP protokolleri uygulandı (Tablo 3.3-3.6).

Tablo 3.2. MSP için reaksiyon karışımı

Reaksiyon Komponenti	Stok Konsantrasyon	Miktar
PCR reaksiyon karışımı (Roche Diag.)	2x	12.5 µl
Forward primer	10 µM	1.25 µl
Reverse primer	10 µM	1.25 µl
DNA örneği	-	5 µl
PCR-grade H ₂ O	-	5 µl

Tablo 3.3. *CDKN1A* için MSP protokolü

Metile primerler için MSP protokolü				Unmetile primerler için MSP protokolü			
Analiz Modu	Döngü	Sıcaklık	Süre	Analiz Modu	Döngü	Sıcaklık	Süre
Pre-inkübasyon	1	95°C	3 dk	Pre-inkübasyon	1	95°C	3 dk
Amplifikasyon	40			Amplifikasyon	40		
Denatürasyon		95°C	30 sn	Denatürasyon		95°C	30 sn
Annealing		48°C	30 sn	Annealing		45°C	30 sn
Ekstensiyon		72°C	1 dk	Ekstensiyon		72°C	1 dk
Final ekstensiyon	1	72°C	10 dk	Final ekstensiyon	1	72°C	10 dk

Tablo 3.4. *CDKN1B* için MSP protokolü

Metile primerler için MSP protokolü				Unmetile primerler için MSP protokolü			
Analiz Modu	Döngü	Sıcaklık	Süre	Analiz Modu	Döngü	Sıcaklık	Süre
Pre-inkübasyon	1	95°C	3 dk	Pre-inkübasyon	1	95°C	3 dk
Amplifikasyon	40			Amplifikasyon	40		
Denatürasyon		95°C	30 sn	Denatürasyon		95°C	30 sn
Annealing		49°C	30 sn	Annealing		43°C	30 sn
Ekstensiyon		72°C	1 dk	Ekstensiyon		72°C	1 dk
Final ekstensiyon	1	72°C	10 dk	Final ekstensiyon	1	72°C	10 dk

Tablo 3.5. CDKN2A için MSP protokolü

Metile primerler için MSP protokolü				Unmetile primerler için MSP protokolü			
Analiz Modu	Döngü	Sıcaklık	Süre	Analiz Modu	Döngü	Sıcaklık	Süre
Pre-inkübasyon	1	95°C	3 dk	Pre-inkübasyon	1	95°C	3 dk
Amplifikasyon	40			Amplifikasyon	40		
Denatürasyon		95°C	30 sn	Denatürasyon		95°C	30 sn
Annealing		59°C	30 sn	Annealing		54°C	30 sn
Ekstensiyon		72°C	1 dk	Ekstensiyon		72°C	1 dk
Final ekstensiyon	1	72°C	10 dk	Final ekstensiyon	1	72°C	10 dk

Tablo 3.6. CDKN2B için MSP protokolü

Metile primerler için MSP protokolü				Unmetile primerler için MSP protokolü			
Analiz Modu	Döngü	Sıcaklık	Süre	Analiz Modu	Döngü	Sıcaklık	Süre
Pre-inkübasyon	1	95°C	3 dk	Pre-inkübasyon	1	95°C	3 dk
Amplifikasyon	40			Amplifikasyon	40		
Denatürasyon		95°C	30 sn	Denatürasyon		95°C	30 sn
Annealing		51°C	30 sn	Annealing		47°C	30 sn
Ekstensiyon		72°C	1 dk	Ekstensiyon		72°C	1 dk
Final ekstensiyon	1	72°C	10 dk	Final ekstensiyon	1	72°C	10 dk

PCR reaksiyonlarının tamamlanmasını takiben, örnekler %1'lik agaroz jel elektrofezinde (BioRad) 90 V'da yürütüldü ve jel görüntüleri alındı. Jel görüntülemeye 100 bp'lik moleküler ağırlık marker'ı (Thermo Scientific, Fermentas) kullanıldı. Jel görüntülerinde hedef her bir gene özgün metile ve unmetile primer setleri ile yapılan MSP sonrası bant büyüklükleri analiz edildi ve metilasyon durumları değerlendirildi.

3.8.Dot Blot Analizi

Eksozomal ve genomik DNA örneklerinin hedef genlerdeki metilasyon durumları açısından birebir uyumunu gördükten sonra, bu uyumun genom çaplı olup olmadığını araştırmak amacı ile elimizde DNA örneği bulunan bazı örneklerde dot blot analizi yapıldı.

Dot blot analizinde uygulanan basamaklar, ana hatları ile aşağıda verilmiştir:

- 1) DNA örnekleri 0.4 N NaOH ile denature edildi (30 dk) ve ardından buza alındı.
- 2) DNA örneklerine eşit miktarda 0.95 M Tris (pH 6.8) eklenerek nötralize edildi. Ardından her bir örneğin 2 katlı 4 seri dilüsyonları (50 ng'dan başlayarak) yapıldı.
- 3) Dilüe edilen örnekler (5 µl), aralarında 1 cm boşluk olacak şekilde Nylon membrana (Hybond-N⁺, American Biosciences) damlatıldı. Membran 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 4) İnkübasyon sonrası, membran DNA'nın bağlanması için Stratalinker® UV crosslinker'a (Vilbert Leurmart) yerleştirildi ve 0.120 Joule'de 1 dk bekletildi.
- 5) Ardından membran %1 süt tozu içeren TBST'de oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası membran 2 kez 5'er dk olmak üzere TBST'de yıkandı.
- 6) Membran, final konsantrasyonu 1 µg/ml primer antikor (Anti-5-metilsitozin (5-mC) antikor, Abcam) içerecek şekilde 10 ml'lik %1'lik süt tozu içeren TBST'ye aktarıldı ve +4°C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası, membran 5 kez 5'er dk olmak üzere TBST'de yıkandı.
- 7) Membran, 1:4000 dilüe olacak şekilde sekonder antikor (Goat Anti-Rabbit IgG H&L, Abcam) içeren TBST'ye aktarıldı ve oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası membran 5 kez 5'er dk olmak üzere TBST'de yıkandı.
- 8) DNA-primer antikor etkileşimlerini gözlemlemek için membran boyandı (Luminata Crescendo Western HRP substrate, Milipore) ve görüntüleri alındı (G-Box Chemi-XR9, Syngene).

3.9. Mutasyon Analizi

Eksozomal DNA ve FFPE doku örneklerinden elde edilen genomik DNA'ların *EZH2*'nin hot-spot (Y641) mutasyonunu taşıyıp taşımadıklarının belirlenmesi amacıyla hizmet alımı yolu ile DNA dizi analizi yapıldı. Bu amaçla kullanılan primer setleri Tablo 3.7'de yer almaktadır.

Tablo 3.7. EZH2 Y641 mutasyon analizinde kullanılan primer setleri

Hedef Gen	Baz dizisi (5'→3')
<i>EZH2</i> (ekzon 16)	
Forward	GCATCTATTGCTGGCACCATC
Reverse	CATTTCCAATCAAACCCACAGA

Kısaca, ilk aşamada hedef genlere özgün primerler ve PCR1 sw AmpliTaq Gold 360 Master karışımları kullanılarak PCR tamamlandı. PCR sonrası, pürifikasyon aşamasına geçildi ve sonrasında BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit kullanılarak DNA örneklerinin dizi analizi aşamaları tamamlandı (ABI 3500 Genetic Analyser, USA).

3.10.Total RNA İzolasyonu

3.10.1. Eksozom Örneklerinden Total RNA izolasyonu

DBBHL hastaları ve sağlıklı gönüllü bireylerin plazma örneklerinden elde edilen eksozomların *EZH2* ve *EZH2*'nin hedef genlerine ait mRNA'ları içerip içermediklerinin belirlenmesi amacıyla, eksozom örneklerinden total RNA izolasyonu yapıldı. Total RNA izolasyonu öncesinde eksternal RNA kontaminasyonunu önlemek amacı ile, eksozom örneklerine RNaz A (Invitrogen) uygulaması yapıldı. Özetle, 100 µl eksozom örneği (PBS içinde) üzerine 5 µl RNaz A enzimi (20 mg/ml) eklendi ve 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası, enzimin inaktivasyonu için örnekler 65°C'de 10 dk inkübe edildi ve sonrasında RNA izolasyon aşamasına geçildi.

Aşağıda total RNA izolasyonu amacı ile uygulanan basamaklar, ana hatları ile yer almaktadır:

- 1) 300 µL eksozom örneği üzerine 100 µl doku lizis tamponu (Ambion) ve 1 mL Trizol (Roche) eklendi.
- 2) Örnek üzerine kloroform (Sigma) eklenerek faz ayrımının oluşması sağlandı ve en üstte yer alan aköz fazdan 750-800 µl alınarak steril bir tüpe aktarıldı.
- 3) RNA presipitasyonu için izopropil alkol (AppliChem) eklendi ve sonrasında RNA %70'lik etanol (Sigma) ile yıkandı.
- 4) Alkolün uzaklaştırılmasını takiben RNA, RNaz-free suda (Ambion) çözdürüldü.
- 5) Elde edilen total RNA'nın miktarı spektrofotometrik olarak (NanoDrop, Thermo) ölçüldü ve hesaplandı.

3.10.2.FFPE Doku Örneklerinden Total RNA İzolasyonu

EZH2 ve *EZH2*'nin hedef genlerine ait mRNA içerikleri açısından, DBBHL hastalarının tanı aldıkları tümör doku örnekleri ve plazma eksozom örnekleri arasındaki uyumu belirlemek amacı ile, FFPE doku örneklerinden de Trizol reagenti kullanılarak total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. FFPE doku örneklerinden DNA izolasyonu protokolde olduğu gibi, ilk olarak doku örneklerinin etrafında bulunan fazla parafin steril bistüri ve pens yardımı ile mekanik olarak uzaklaştırıldı. Deparafinizasyon amacı ile ksilen kullanıldı ve sonrasında ksileni uzaklaştırmak amacı ile etanol kullanıldı. Bu aşamadan sonra bir önceki basamakta belirtildiği şekilde Trizol reagenti kullanılarak total RNA izolasyonu tamamlandı. Elde edilen total RNA'nın miktarı spektrofotometrik olarak (NanoDrop, Thermo) ölçüldü ve hesaplandı.

3.11.Total RNA örneklerinden cDNA sentezi

İzole edilen total RNA örneklerinden cDNA sentezi, ticari kit (One Script Plus cDNA sentez kiti) kullanılarak gerçekleştirildi. Aşağıda cDNA sentezi için uygulanan basamaklar, ana hatları ile yer almaktadır:

1) İzole edilen her bir total RNA örneği için tablo 3.8'de tanımlanan reaksiyon karışımı hazırlandı:

Tablo 3.8. cDNA sentezi için reaksiyon karışımı

Reaksiyon Komponenti	Miktar
dNTP karışımı	1 µl
Random primer	1 µl
RNase-free su	X µl (Her bir örnek için ayrı hesaplandı)
Total RNA örneği	X µl (Son konsantrasyonu 2 µg total RNA olacak şekilde hesaplandı)
Toplam Hacim	14,5 µl

2) Hazırlanan reaksiyon karışımı 65 °C'de 5 dk inkübe edildi ve sonrasında buzda 3 dk inkübe edildi.

3) Örnekler thermal cycler'da (Nyx Teknik, Inc. USA) önce 98°C'de 10 dk ve sonrasında 64°C'de 2.5 saat inkübe edildi.

4) Sonrasında thermal cycler'da 25°C'de 10 dk, 50°C'de 15 dk ve sonrasında 85°C'de 10 dk inkübe edilerek cDNA örnekleri elde edildi. Örnekler analiz aşamasına kadar -20°C'de saklandı.

3.12. Gerçek-zamanlı PCR

DBBHL hastalarının plazma eksozom örneklerinin *EZH2*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN2A* ve *CDKN2B* mRNA'larını içerip içermediklerinin ve bu ekspresyon profilinin karşılıkları olan tümör doku örneklerinde var olup olmadığının belirlenmesi amacı ile gerçek-zamanlı PCR protokolü uygulandı (Tablo 3.9-10). *EZH2* (Assay ID: 110296), *CDKN1A* (Assay ID: 144097), *CDKN1B* (Assay ID: 100855), *CDKN2A* (Assay ID: 101437), *CDKN2B* (Assay ID: 101439) ve *β-aktin* (Assay ID: 143636) genlerinin ekspresyon analizinde kullanılacak primer-prob setleri Universal Probe Library (UPL)'den (Roche Diagnostic) seçildi.

Tablo 3.9. Gerçek-zamanlı PCR komponentleri

Komponent	Miktar
Master Karışımı	10 µl
Primer-Prob Karışımı (Single assay)	1 µl
PCR-grade su	5 µl
cDNA örneği	4 µl

Tablo 3.10. Gerçek-zamanlı PCR protokolü*

Analiz Modu	Döngü	Segment	Sıcaklık	Süre	Kazanım Modu
Pre-inkübasyon					
	1		95 °C	10 dk	-
Amplifikasyon					
	50	Denatürasyon	95 °C	10 sn	-
		Annealing	60 °C	30 sn	Tek
		Ekstensiyon	72 °C	1 sn	-
Soğutma					
	1		40 °C	30 sn	-

*: Gerçek-zamanlı PCR Protokolü; LightCycler 1.5 PCR sisteminde (Roche Diagnostics) gerçekleştirildi ve **Pre-inkübasyon**: Enzim aktivasyonu ve kalıp DNA'nın denatürasyonu, **Amplifikasyon**: Hedef bölgenin primerler yardımı ile çoğaltılması, **Soğutma**: Sistemde yer alan termal bloğun soğutulması basamaklarını içermektedir.

3.13. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel değerlendirmeler SPSS 17.0 programında gerçekleştirildi. $P \leq 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1. DBBHL hastalarına ve kontrol grubuna ait klinikopatolojik veriler

Çalışmaya dahil edilen olgu grubunda 11 kadın ve 10 erkek hasta yer aldı. Bu hastaların yaş ortalamaları 62.5 ± 15.12 olarak hesaplandı. Kontrol grubunda 8 kadın ve 13 erkek birey yer aldı ve yaş ortalamaları 65.6 ± 14.0 olarak hesaplandı. Materyal ve metod bölümünde belirtilen kriterlere göre değerlendirilen DBBHL hastalarına ait demografik veriler Tablo 4.1’de özetlendi.

Tablo 4.1.DBBHL hastalarına ait demografik veriler

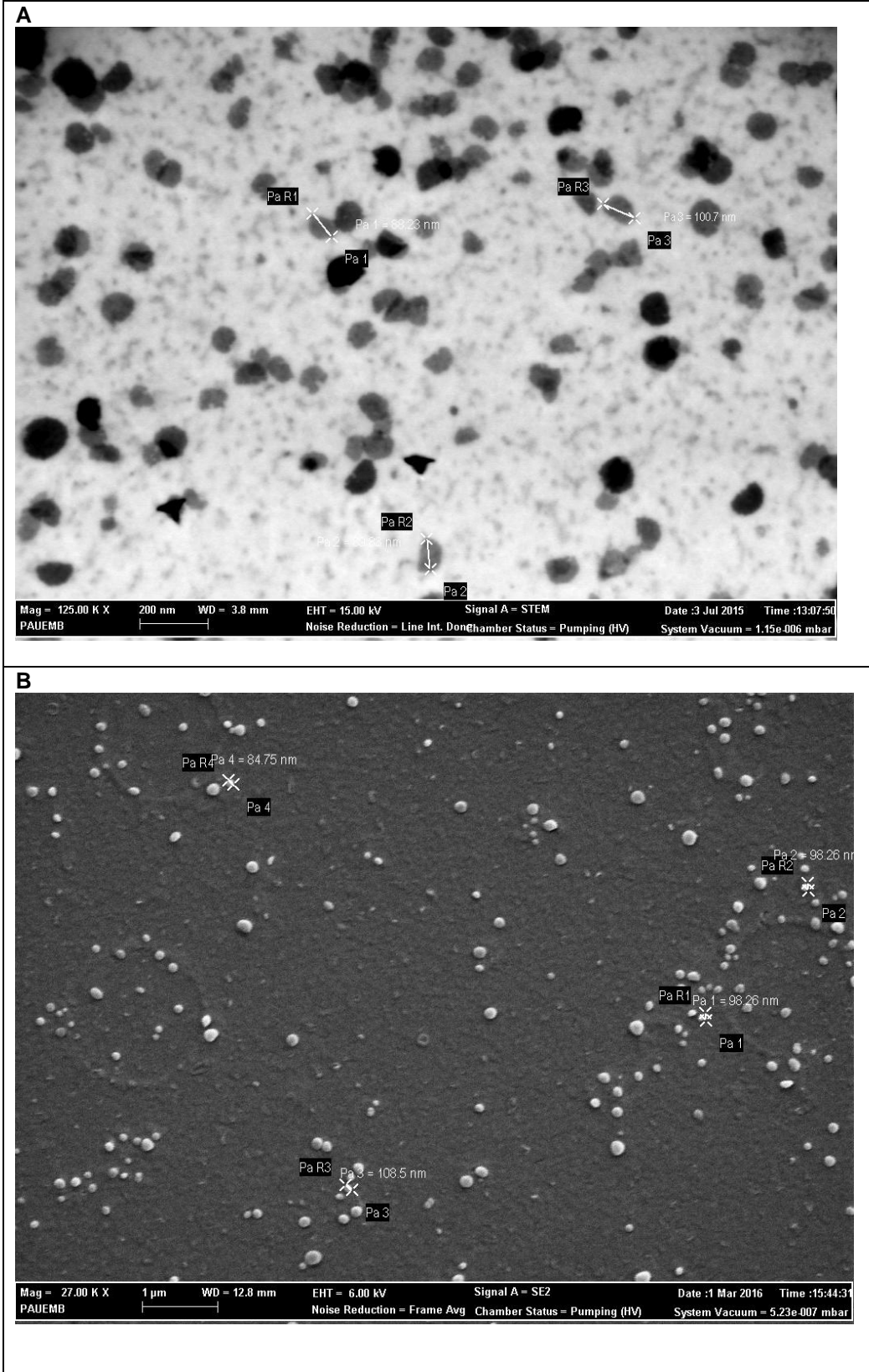
	Hasta Sayısı (n)	%
Immunofenotip		
GC	5	24
Non-GC	16	76
Evre		
Erken Evre (I-II-III)	8	38
İleri Evre (IV)	13	62
IPI		
Düşük (0-1-2)	10	47
Yüksek (3-4-5)	11	53
Tutulum		
Nodal	7	33
Extranodal	14	67
Sağkalım		
>24 ay	9	43
<24 ay	12	57

4.2. Sağlıklı gönüllü bireyler ve DBBHL hastalarının plazma örneklerinden eksozom izolasyonu ve karakterizasyonu

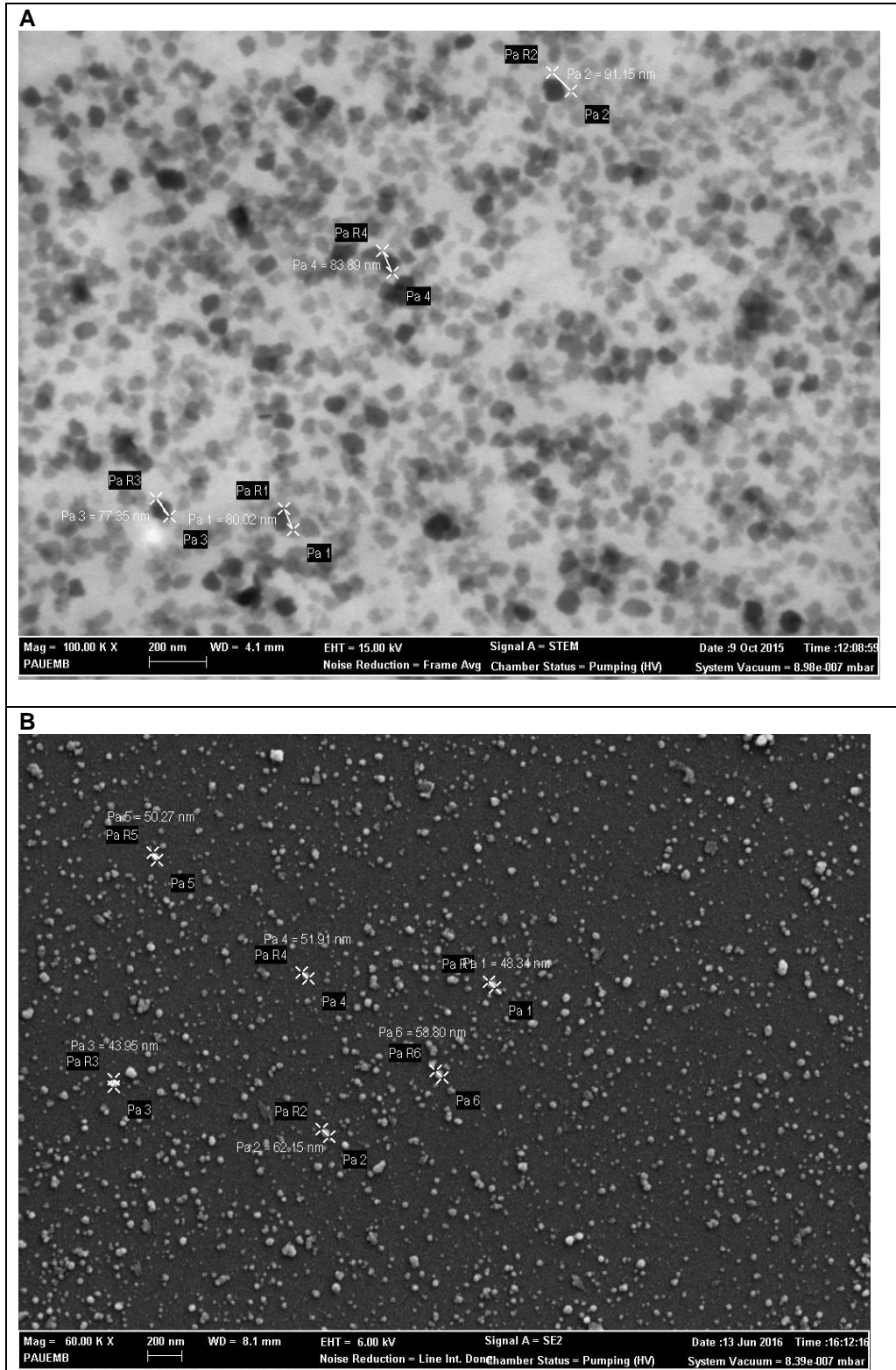
Çalışmaya dahil edilen tüm plazma örneklerinden başarılı bir biçimde eksozom izolasyonları gerçekleştirildi. Aşağıda, izole edilen eksozomların karakterizasyonları ile ilgili bulgular yer almaktadır.

4.2.1 Eksozomların morfolojik karakterizasyonu

STEM ve SEM analizlerinde, sağlıklı gönüllü bireyler ve DBBHL hastaların plazmalarından izole edilen eksozomların, beklendiği gibi 40-120 nm çapında oldukları belirlendi. Şekil 4.1 ve 4.2’te sırası ile sağlıklı gönüllü bireyden ve DBBHL hastasından izole edilen eksozomlara ait örnek elektron mikroskopi görüntüleri yer almaktadır.



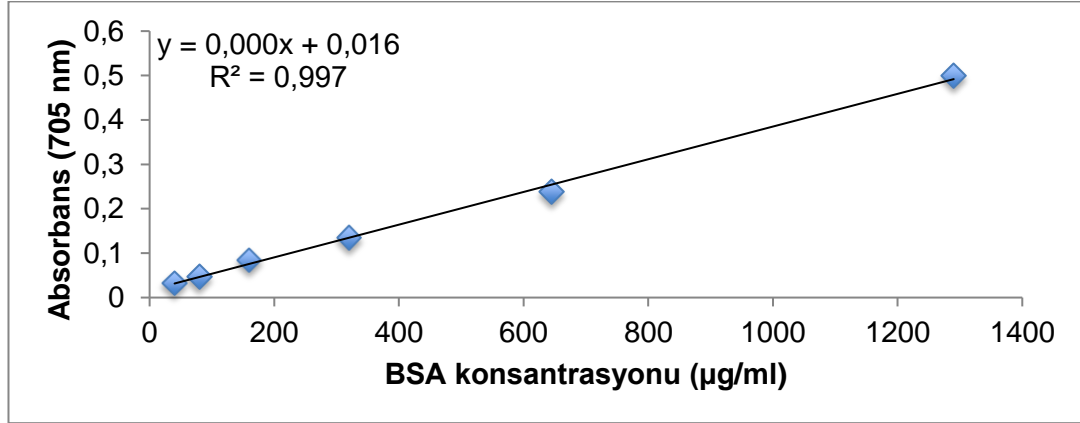
Şekil 4.1. Sağlıklı gönüllü bireye ait plazma örneğinden izole edilen ekzozomların (A) STEM ve (B) SEM görüntüleri. **Pa**: Hedef partikül. **PaR**: Elektron Mikroskopi analiz sisteminde ölçer 'Point to point measure' ile partikülün çapı.



Şekil 4.2. DBBHL hastasına ait plazma örneğinden izole edilen eksozomların (A) STEM ve (B) SEM görüntüleri. **Pa:** Hedef partikül. **PaR:** Elektron Mikroskopi analiz sisteminde ölçek 'Point to point measure' ile partikülün çapı.

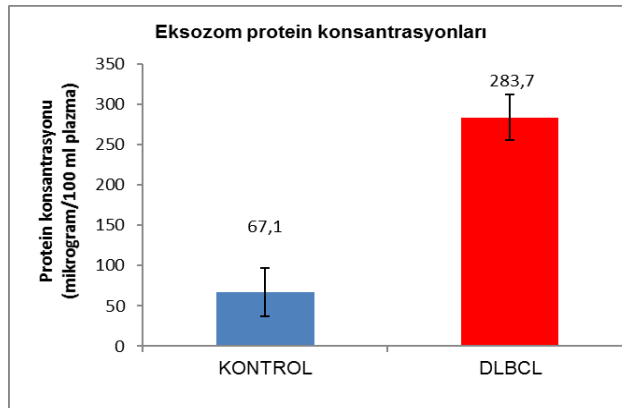
4.2.2 Eksozomların total protein konsantrasyonları

DBBHL hastaları ve sağlıklı gönüllü bireylerden izole edilen eksozom örneklerinde, Bradford yöntemi kullanılarak eksozomal total protein miktarları belirlendi. Şekil 4.3'te eksozom örneklerindeki protein miktar tayini için belirlenen örnek Bradford kalibrasyon eğrisi yer almaktadır.



Şekil 4.3. Eksozom örneklerinde total protein miktar tayini için kullanılan Bradford standart grafiği.

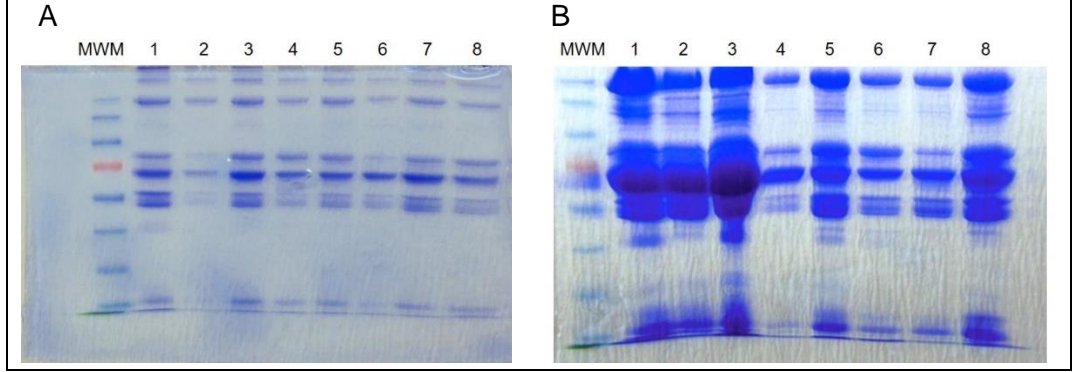
Kontrol grubunu oluşturan sağlıklı bireylerin plazma örneklerinden izole edilen eksozomlardaki total protein ortalama konsantrasyonu $67,10 \pm 29,8$ µg/100 ml plazma (aralık 54,4-105,46 µg/100 ml) olarak belirlendi. DBBHL grubunda ise ortalama total protein konsantrasyonu $283,7 \pm 27,9$ µg/100 ml plazma (aralık 121,6-575,3 µg/100 ml) olarak saptandı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Sağlıklı gönüllü bireyler ve DBBHL hastalarının plazma örneklerinden izole edilen eksozomlardaki total protein konsantrasyonları

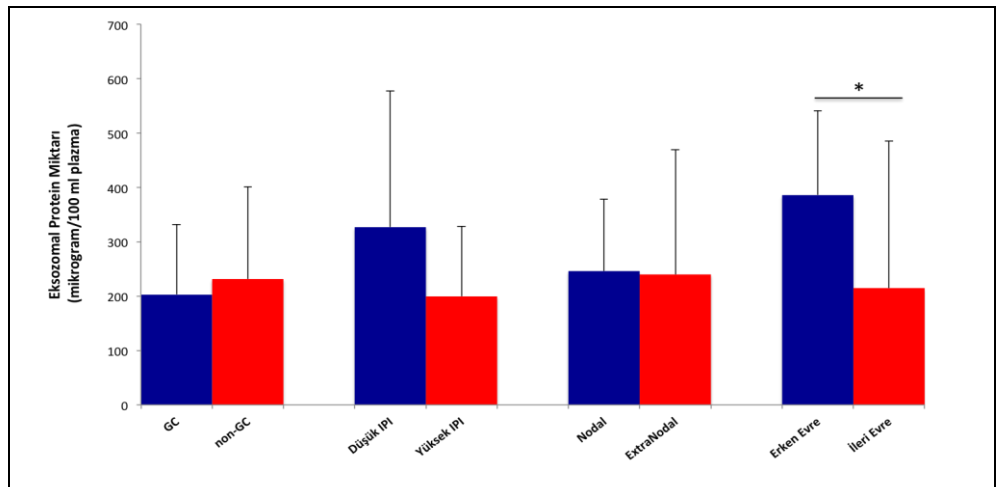
Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında, DBBHL hastalarının eksozomal protein miktarının 3,2 kat daha fazla olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi

($p=0.001$). Sağlıklı gönüllü bireyler ve DBBHL hastalarına ait eksozomal proteinlerin SDS-PAGE sonrası elde edilen jel görüntülerinde de bu bulguyu destekleyici nitelikte olarak, DBBHL eksozom örneklerinin kontrol grubuna göre daha fazla protein içerdiği gözlemlendi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. (A) Sağlıklı gönüllü bireylerin ve (B) DBBHL hastalarının plazma örneklerinden izole edilen eksozomlardaki total proteinlerin Coomassie blue ile boyalı örnek SDS-PAGE jel görüntüleri (MWM: Moleküler Weight Marker, 10-250 kDa, ThermoSci., 26619).

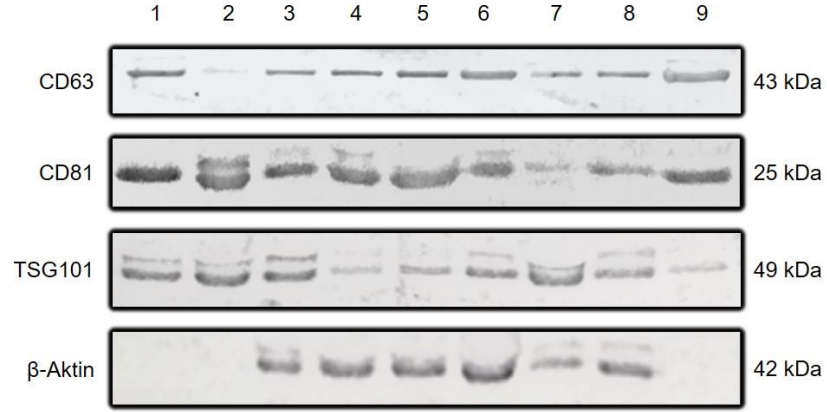
Her ne kadar eksozom karakterizasyonu amacı ile total protein konsantrasyonlarını belirlemiş olsak da, bu konsantrasyonların DBBHL hastalarına ait klinikopatolojik özelliklere göre dağılımlarını incelediğimizde immunofenotip, tutulum ve IPI skorları arasında anlamlı bir ilişki bulunmazken (sırası ile $p=0.32$, $p=0.95$ ve $p=0.19$) erken evre olgularda total protein konsantrasyonunun anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlendi ($p=0.001$) (Şekil 4.6). Yukarıda da bahsettiğimiz üzere, eksozom karakterizasyonu amacı ile total protein konsantrasyonları belirlendiğinden ve ayrıca total protein konsantrasyonundan çok, eksozomların içerdikleri proteinlerin identifikasyonunun önemli olduğu gerekçeleri ile erken evrede gözlenen bu anlamlı değişim tartışılmayacaktır.



Şekil 4.6. DBBHL hastalarının eksozomal protein konsantrasyonlarının klinikopatolojik özelliklere göre dağılımı (*: $p<0.05$)

4.2.3 Eksozomların Yüzey Belirteçleri

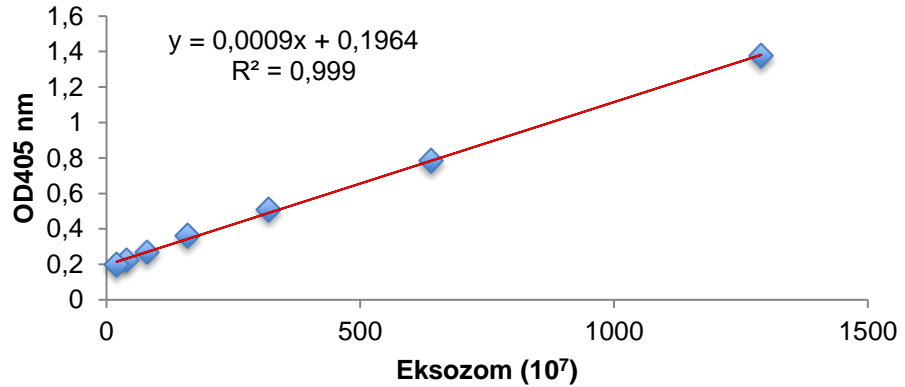
Sağlıklı gönüllü bireylerin plazma örneklerinden izole edilen tüm eksozom örneklerinin CD63, CD81 ve TSG101 yüzey belirteçleri ile β -aktin proteinini içerdikleri belirlendi. DBBHL hastalarının plazma örneklerinden izole edilen tüm eksozom örneklerinin de CD63, CD81 ve TSG101 yüzey belirteçlerini taşıdıkları ancak, 3 hastaya ait eksozomların β -aktin proteinini içermedikleri belirlendi. Şekil 4.7’de DBBHL hastalarına ait eksozomlarda hedef yüzey belirteçleri ve β -aktin proteinlerine özgün, Western Blot örnek görüntüleri yer almaktadır.



Şekil 4.7. DBBHL hastalarına ait eksozom örneklerinde Western Blot analiz görüntüleri. L1-9: 1-9 nolu hastalara ait plazma örneklerinden izole edilen eksozomlarda sırası ile CD63, CD81, TSG101 ve β -aktin antikorlarına karşı elde edilen protein fragmanları yer almaktadır.

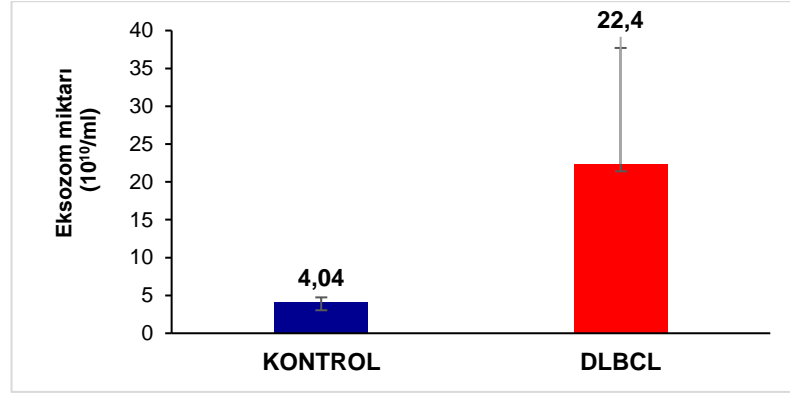
4.2.4 Sağlıklı Gönüllü Bireyler ve DBBHL Hastalarının Plazma Örneklerinde Varolan Eksozom Konsantrasyonları

Çalışmada değerlendirilen 21 sağlıklı gönüllü bireye ve 21 DBBHL hastasına ait plazma örneklerinden başarılı bir biçimde eksozom izolasyonu ve karakterizasyonu tamamlandıktan sonra, eksozom konsantrasyonları ticari kit yardımı ile belirlendi. Kit içeriğinde yer alan standartlar kullanılarak hazırlanan örnek standart grafiği Şekil 4.8’de yer almaktadır.



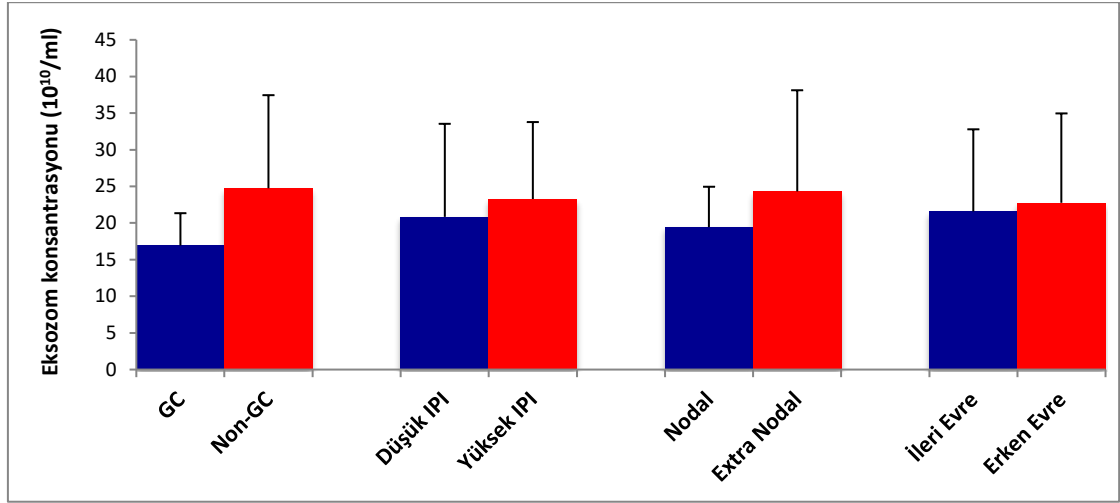
Şekil 4.8. EXOCET standart grafiği.

Sağlıklı gönüllü bireylerin plazma eksozom konsantrasyonu ortalama $4,04 \times 10^{10} \pm 3,25/\text{ml}$ (aralık $1,09-8,74 \times 10^{10}/\text{ml}$) olarak belirlendi. DBBHL olgularının plazma örneklerinden izole edilen eksozom konsantrasyonu ise ortalama $22,4 \times 10^{10} \pm 1,2/\text{ml}$ (aralık $9,5-51,18 \times 10^{10}/\text{ml}$) olarak belirlendi (Şekil 4.9). Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında, DBBHL olgularında eksozom konsantrasyonunun yaklaşık 6 kat daha fazla olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p=0.0001$).



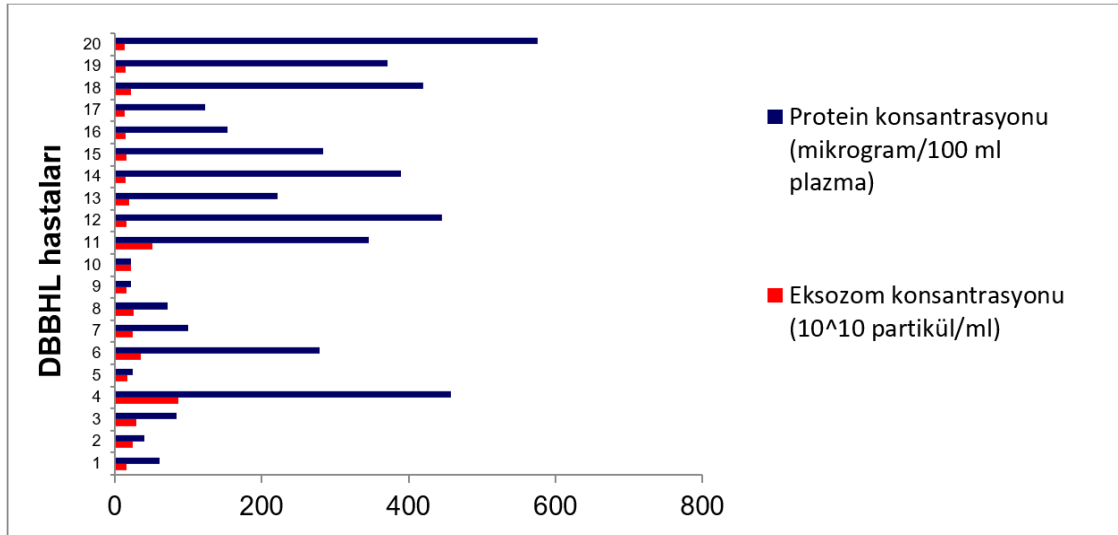
Şekil 4.9. Sağlıklı gönüllü bireyler ve DBBHL hastalarının plazma örneklerinden izole edilen eksozom konsantrasyonları.

DBBHL hastalarının plazma eksozom konsantrasyonları, hastalara ait klinikopatolojik özelliklerle karşılaştırıldı (Şekil 4.9). DBBHL hastalarının %23.8'inin ($n=5$) GC ve geride kalan %76.2'sinin Non-GC ($n=16$) alt immunofenotipine sahip oldukları belirlendi ve her iki grup arasında eksozom konsantrasyonu arasında istatistiksel bir anlamlılık gözlenmedi ($p=0.06$). Benzer şekilde, ektranodal tutulumlu (mide, akciğer, beyin vb) lenfoma hastalarının plazma örneklerinde eksozom konsantrasyonları ile nodal tutulumlu hastaların eksozom konsantrasyonları arasında anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0.38$). Klinik evre açısından olgular ileri evre (evre IV) ve erken evre (evre I-II-III) olmak üzere iki ayrı grupta değerlendirildiğinde, evre IV olgularda eksozom konsantrasyonunun erken evre olgulara göre daha düşük olduğunun gözlenmesine karşın, istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı ($p=0.39$). Aynı zamanda hastalar IPI skorlarına göre düşük (0-2) ve yüksek (3-5) kategoride gruplandırıldığında eksozom konsantrasyonları arasında anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0.65$) (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. DBBHL hastalarının plazma eksozom konsantrasyonlarının klinikopatolojik özelliklere göre dağılımı

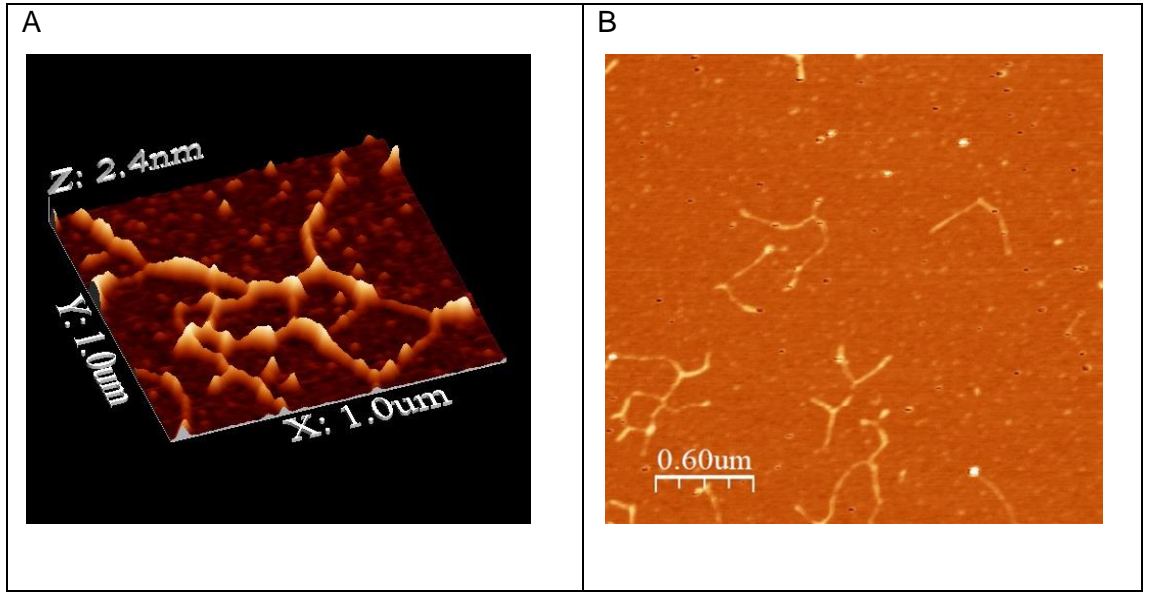
Eksozom konsantrasyon artışı ve eksozomal protein konsantrasyon artışı arasında bir paralellik olup olmadığı araştırıldığında, Şekil 4.11'de görüldüğü üzere, eksozom konsantrasyonu ve eksozomların içerdiği protein konsantrasyonu arasında anlamlı bir korelasyon bulunmadı ($p=0.409$, $R=-0.316$). Örneğin eksozom konsantrasyonu en yüksek olan 4 no'lu hastanın protein konsantrasyonu en yüksek belirlenmezken, eksozom konsantrasyonu en düşük olan 20 no'lu hastada da protein konsantrasyonu en yüksek olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.11. DBBHL hastalarına ait eksozom konsantrasyonları ve eksozom içeriğinde bulunan protein miktarları

4.2.5. Eksozomal DNA'nın varlığının gösterilmesi

Çalışma grubunu oluşturan DBBHL hastaları ve sağlıklı gönüllü bireylerin plazma eksozom örneklerinden başarılı bir biçimde DNA izolasyonları yapıldı. İzole edilen tüm DNA örneklerinin konsantrasyonlarının ortalaması 4.16 ± 0.65 ng/ μ l (aralık 2.9 -5.7 ng/ μ l) olarak hesaplandı. Görüldüğü üzere, eksozomal DNA'ların konsantrasyonları son derece düşüktü. Eksozomal DNA'nın varlığını teyit amacı ile ayrıca, bir adet DBBHL hastasına ait eksozomal DNA örneği AFM ile görüntülendi. Eksozomal DNA'nın çift iplikli (Şekil 4.12-A) ve fragmente (Şekil 4.12-B) DNA olduğu belirlendi.



Şekil 4.12. AFM ile eksozomal DNA örneğinin 3-boyutlu (A) ve 2-boyutlu topografik görüntüsü (B)

4.2.6. FFPE doku örneklerinden izole edilen genomik DNA konsantrasyonları

Çalışma grubunu oluşturan DBBHL hastalarının FFPE doku örneklerinin tümünden başarılı bir biçimde DNA izolasyonları yapıldı. İzole edilen tüm DNA örneklerinin konsantrasyonlarının ortalaması 72.57 ± 73.66 ng/ μ l (aralık 4.2 -244,1 ng/ μ l) olarak hesaplandı.

Çalışma grubunu oluşturan DBBHL hastaları ve sağlıklı gönüllü bireylerin plazma eksozom örneklerinden başarılı bir biçimde total RNA izolasyonları yapıldı. DNA konsantrasyonunun aksine, plazma eksozom örneklerinden izole edilen total RNA konsantrasyonlarının son derece yüksek oldukları (ortalama 145.9 ± 50.47 ng/ μ l) belirlendi.

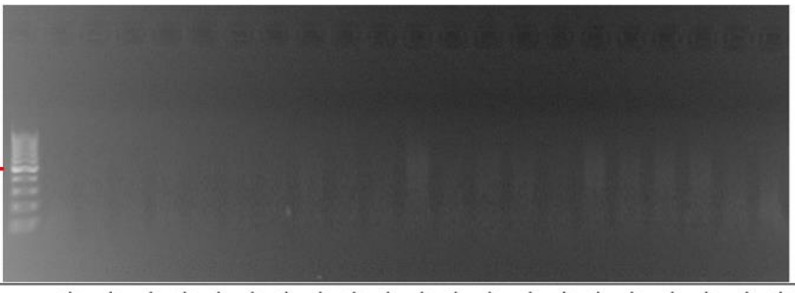
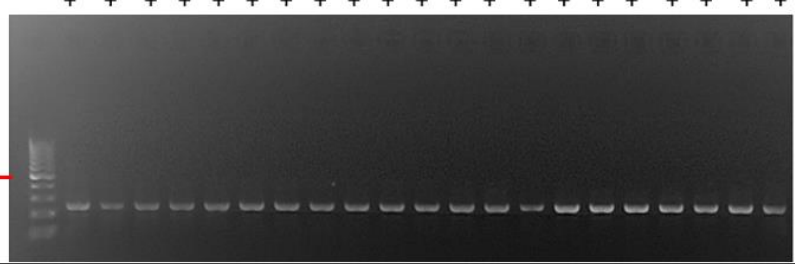
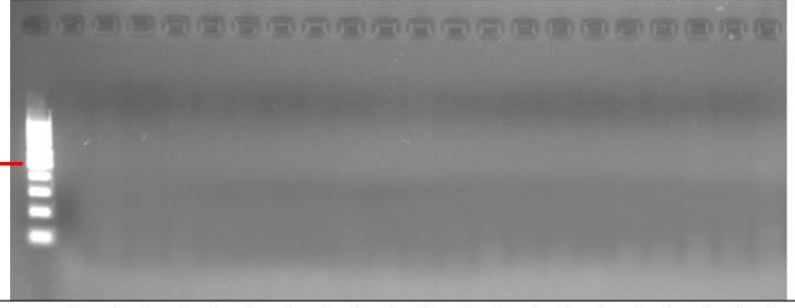
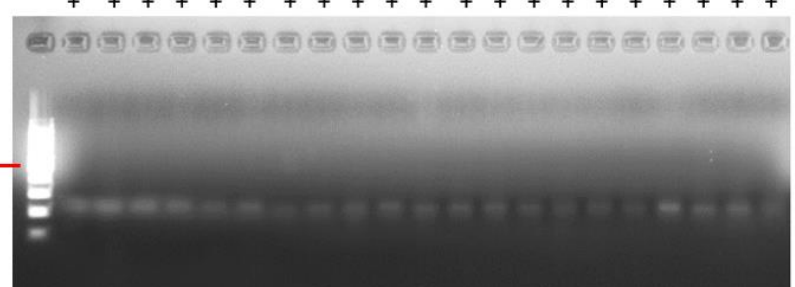
4.3. EZH2 Hedef Genlerinin Metilasyon Paternleri

Hedef genlerin (*CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN2A* ve *CDKN2B*) promoter bölgelerine özgün primer setleri kullanılarak gerçekleştirilen MSP sonuçları aşağıda yer almaktadır. MSP sonuçlarına göre herbir örnek “metile” veya “unmetile” olarak değerlendirilmiştir. *CDKN1A* için eksozomal DNA örnekleri ile yapılan analizlerde, 14 örnekte informatif veri elde edilmişken, 7 örnekte sonuç alınamamıştır. Eksozomal DNA konsantrasyonlarının düşük olması, bisülfid-uygulamasından elde edilen DNA konsantrasyonlarının düşük olması ve bisülfid uygulaması sırasında kullanılan kimyasalların DNA’da degradasyona neden olması (örn; sodyum bisülfitle inkübasyonda pirimidin bazlarının hasarlanması) bu örneklerden sonuç alınamamasının nedenleri olabilir. Eksozomal DNA konsantrasyonlarının düşük olması nedeniyle çalışma tekrarlanamamıştır. İformatif veri aldığımız tüm örneklerin *CDKN1A* promoter bölgelerinin unmetile oldukları saptandı. FFPE dokulardan izole edilen DNA örneklerinin tümünde de *CDKN1A* promoter bölgelerinin unmetile oldukları gözlemlendi (Şekil 4.13). Dolayısıyla, bu hedef bölge açısından eksozomların primer tümörün özelliklerini birebir yansıttığı belirlendi.

CDKN1A	Örnek No	M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
EKSOZOM	Metile primer	- -
	Unmetile primer	+ + - - - + + + + + + + + + + - - - - + +
FFPE	Metile primer	- -
	Unmetile primer	+ +

Şekil 4.13. CDKN1A için sırasıyla eksozomal DNA örneği ve FFPE dokudan izole edilen genomik DNA örneği kullanılarak metile ve unmetile primerlerle gerçekleştirilen MSP sonrası elektroforez görüntüleri

CDKN1B için hem eksozomal DNA hem de genomik DNA örnekleri ile yapılan analizlerde informatif veri elde edildi. Tüm örneklerde CDKN1B promoter bölgelerinin unmetile oldukları saptandı (Şekil 4.14). Dolayısıyla, bu hedef bölge açısından eksozomların primer tümörün özelliklerini birebir yansıttığı belirlendi.

CDKN1B	Örnek No	M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
EKSOZOM	Metile primer	- - - - - 
	Unmetile primer	+ + + + + 
FFPE	Metile primer	- - - - - 
	Unmetile primer	+ + + + + 

Şekil 4.14. CDKN1B için sırasıyla eksozomal DNA örneği ve FFPE dokudan izole edilen genomik DNA örneği kullanılarak metile ve unmetile primerlerle gerçekleştirilen MSP sonrası elektroforez görüntüleri

CDKN2A için eksozomal DNA örnekleri ile yapılan analizlerde, 19 örnekte informatif veri elde edilmişken, 2 örnekte sonuç alınamamıştır. Bu durum, yukarıda açıkladığımız nedenlerden kaynaklanıyor olabilir. Geride kalan tüm örneklerde CDKN2A promoter metilasyonu saptandı. FFPE doku örneklerini tümünden de sonuç alınarak örneklerin hepsinde CDKN2A promoter metilasyonu saptandı (Şekil 4.15). Dolayısıyla, bu hedef bölge açısından eksozomların primer tümörün özelliklerini birebir yansıttığı belirlendi.

CDKN2A	Örnek No	M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
EKSOZOM	Metile primer		+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	Unmetile primer		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FFPE	Metile primer		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Unmetile primer		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Şekil 4.15. CDKN2A için sırasıyla eksozomal DNA örneği ve FFPE dokudan izole edilen genomik DNA örneği kullanılarak metile ve unmetile primerlerle gerçekleştirilen MSP sonrası elektroforez görüntüleri

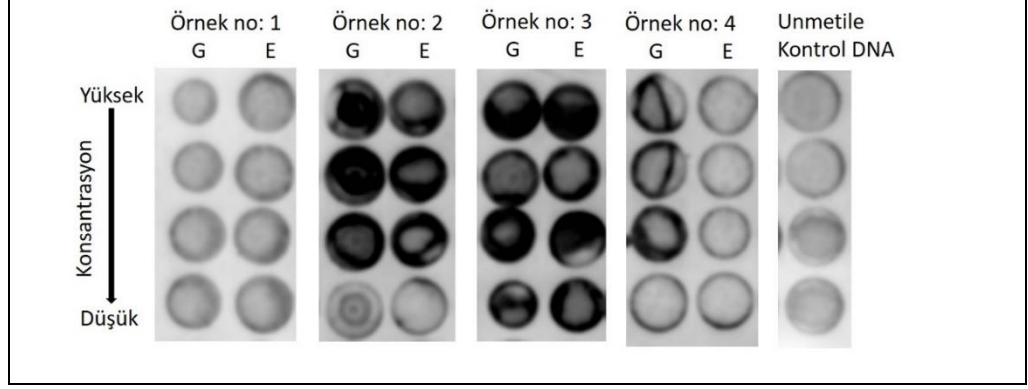
CDKN2B için hem eksozomal DNA hem de genomik DNA örnekleri ile yapılan analizlerde informatif veri elde edildi. Tüm örneklerde CDKN2B promoter bölgelerinin metile oldukları saptandı (Şekil 4.16). Dolayısıyla, bu hedef bölge açısından eksozomların primer tümörün özelliklerini birebir yansıttığı belirlendi.

CDKN2B	Örnek No	M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
EKSOZOM	Metile primer		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Unmetile primer		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FFPE	Metile primer		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Unmetile primer		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Şekil 4.16. CDKN2B için sırasıyla eksozomal DNA örneği ve FFPE dokudan izole edilen genomik DNA örneği kullanılarak metile ve unmetile primerlerle gerçekleştirilen MSP sonrası elektroforez görüntüleri

4.4. DOT BLOT Analiz Sonuçları

Toplam 4 hastaya ait eksozomal ve genomik DNA örnekleri ile yaptığımız Dot Blot analiz sonuçlarına göre ilk üç sırada yer alan örneklerde tüm konsantrasyonlarda eksozomal DNA ve tümör DNA örneklerinde dot-blot profilinin aynı olduğu gözlenirken bir örnekte eksozomal DNA örneğinin genomik DNA profilini yansıtmadığı saptanmıştır (Şekil 4.17).



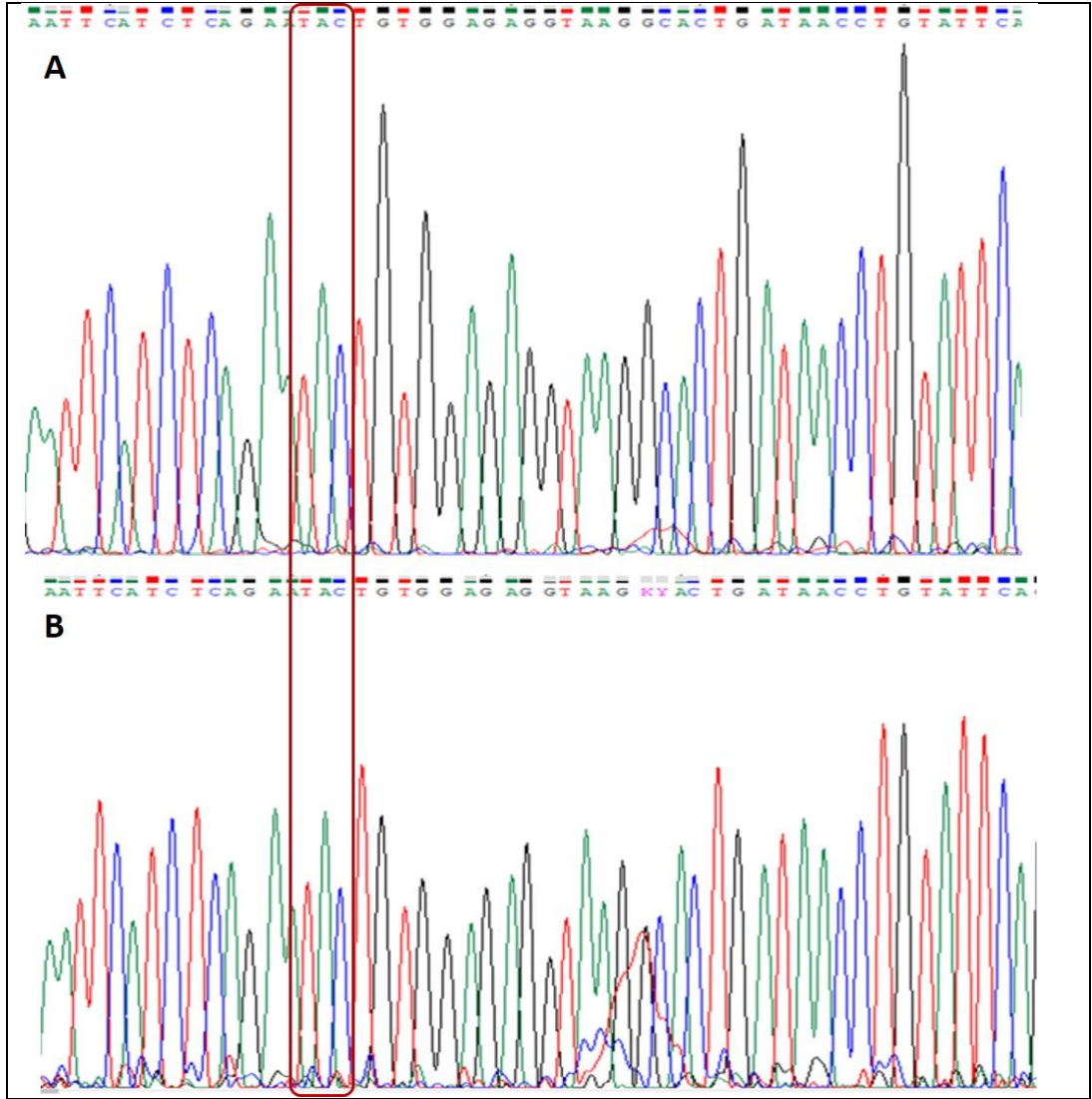
Şekil 4.17. Dot Blot Analiz görüntüleri. (G: FFPE doku örneklerinden izole edilen genomik DNA örneği, E:Eksozomal DNA örneği, Unmetile Kontrol DNA: EpiTect Control DNA Set kiti (Qiagen)'nde yer alan 10 ng/μl konsantrasyonda unmetile kontrol DNA örneği).

4.5.EZH2 Y641 Mutasyon Analiz Sonucu

Tüm eksozomal DNA ve tüm genomik DNA örneklerinde yapılan diiz analizi sonucunda, bütün örneklerin EZH2 hot-spot mutasyonunu taşımadığı gözlenmiş olup, Şekil 4.18'de dizi analiz sonuçları gösterildi.

4.6.EZH2 ve Hedef Genlerinin Ekspresyon Profilleri

Büyük olasılıkla eksozomların aktif salınım mekanizmaları ile açıklanabilecek nedenlerden dolayı tüm eksozomların β -aktin genini içermemesi yanısıra sıklıkla kullanılan 3 housekeeping genin (flottin-2, CD63 ve GAPDH) de hatalı normalizasyonlara neden oldukları belirlenmiştir (Wu vd 2015, Aung vd 2017). Bu nedenle, literatürde eksozom örneklerinde ekspresyon değişimlerinin (artış/azalış) değerlendirilmesinde kullanılacak ve tüm eksozomlarda var olduğu bilinen bir housekeeping gen tanımlanmamıştır. Bu nedenle çalışmadaki amacımız sadece eksozomal hedef moleküllerin varlığının ilgili tümör dokusu ile uyumunun olup olmadığını belirlemektir. Bir başka ifade ile, yukarıda açıkladığımız nedenlerle, hedef mRNA'ları eksozomlarda var veya yok olarak analiz ettik.

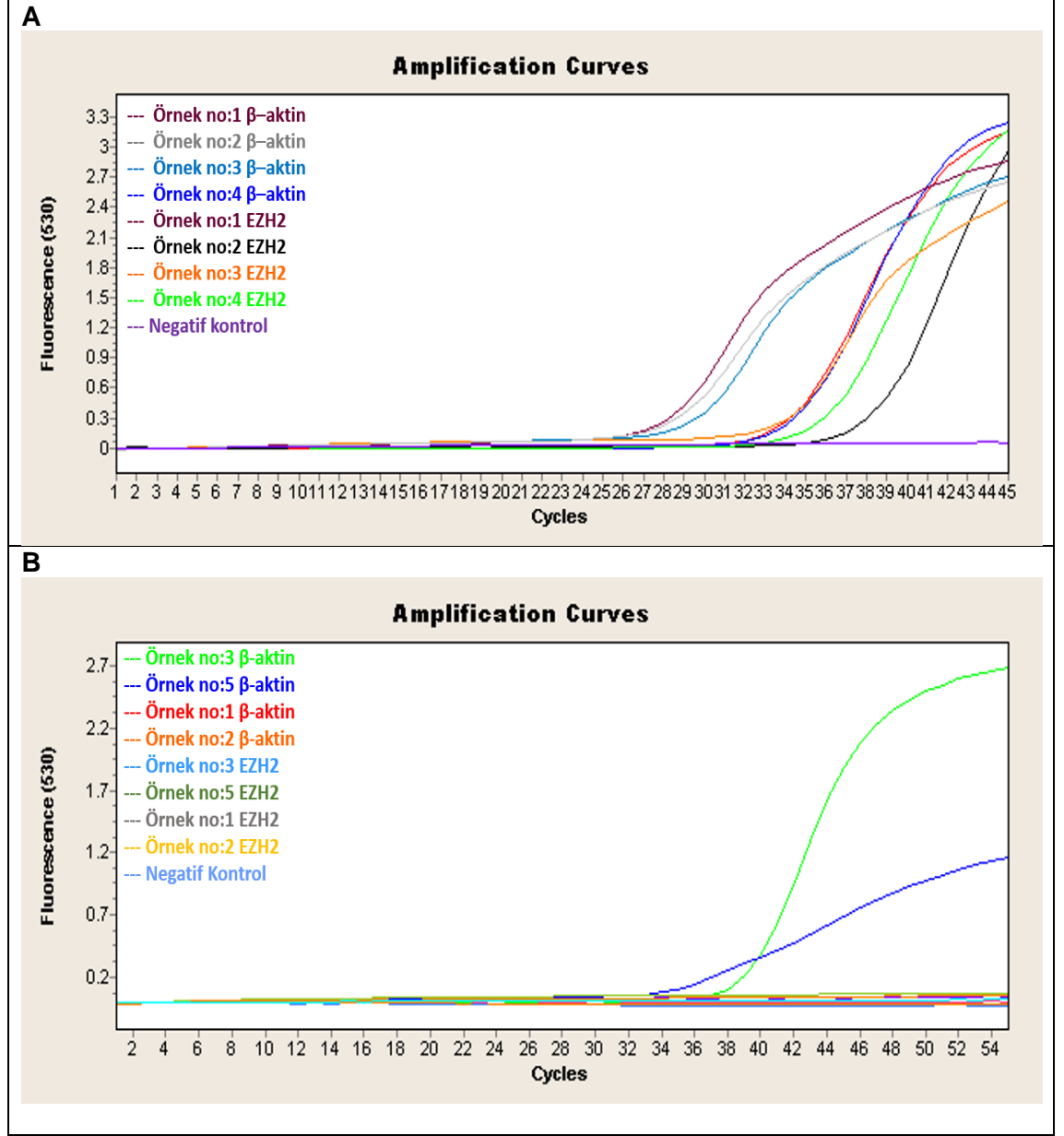


Şekil 4.18. DBBHL hastasına ait eksozomal DNA (A) ve genomik DNA (B) örneğinde *EZH2* Y641 mutasyon analiz sonucu

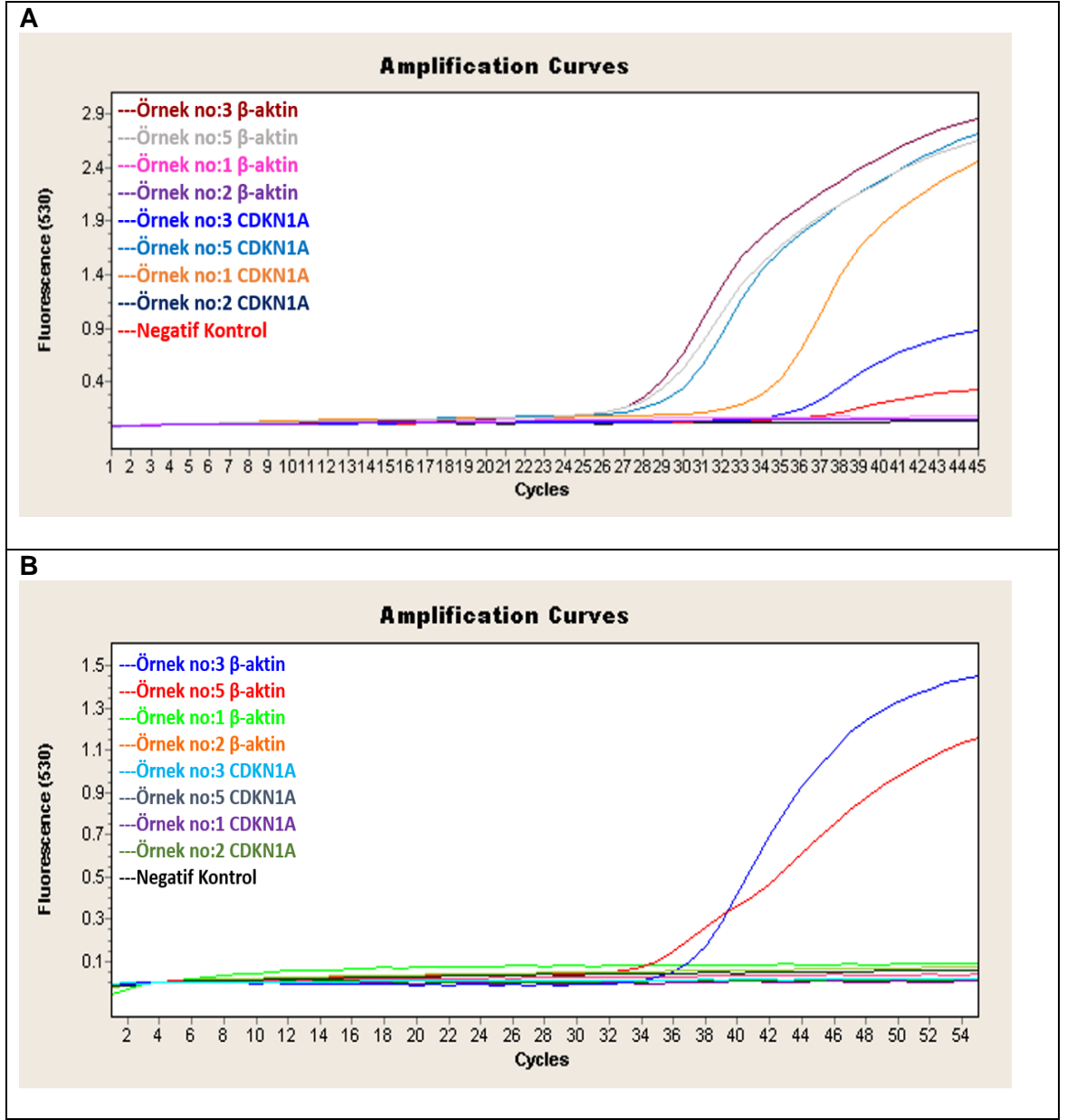
DBBHL hastalarının plazma eksozom örneklerinin *EZH2*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN2A*, *CDKN2B* ve β -*aktin* mRNA'larını içerip içermediklerinin ve karşılıkları olan tümör doku örneklerinde de benzer profilin var olup olmadığının belirlenmesi amacı ile yapılan gerçek-zamanlı PCR sonucunda, tüm örneklerden informatif veriler alındı.

FFPE doku örneklerinin tümünde *EZH2* mRNA'sının varlığı gözlenmişken karşılıkları olan eksozom örneklerinde söz konusu transkriptin varlığına rastlanmadı (Şekil 4.19). Sağlıklı gönüllü bireylerden izole edilen eksozom örneklerinde de *EZH2* ekspresyonu gözlenmedi. FFPE doku örneklerinin 12'sinde (%57) *CDKN1A*; 9'unda (%43) *CDKN2A* mRNA'sının varlığı belirlenirken, aynı örneklerin eksozom karşılıklarında *CDKN1A* ve *CDKN2A* mRNA'larına rastlanmadı (Şekil 4.20 ve 4.21). FFPE doku örneklerinin tümünde *CDKN1B* mRNA'sının varlığı belirlenmiştir ve bu örneklerin karşılıkları olan

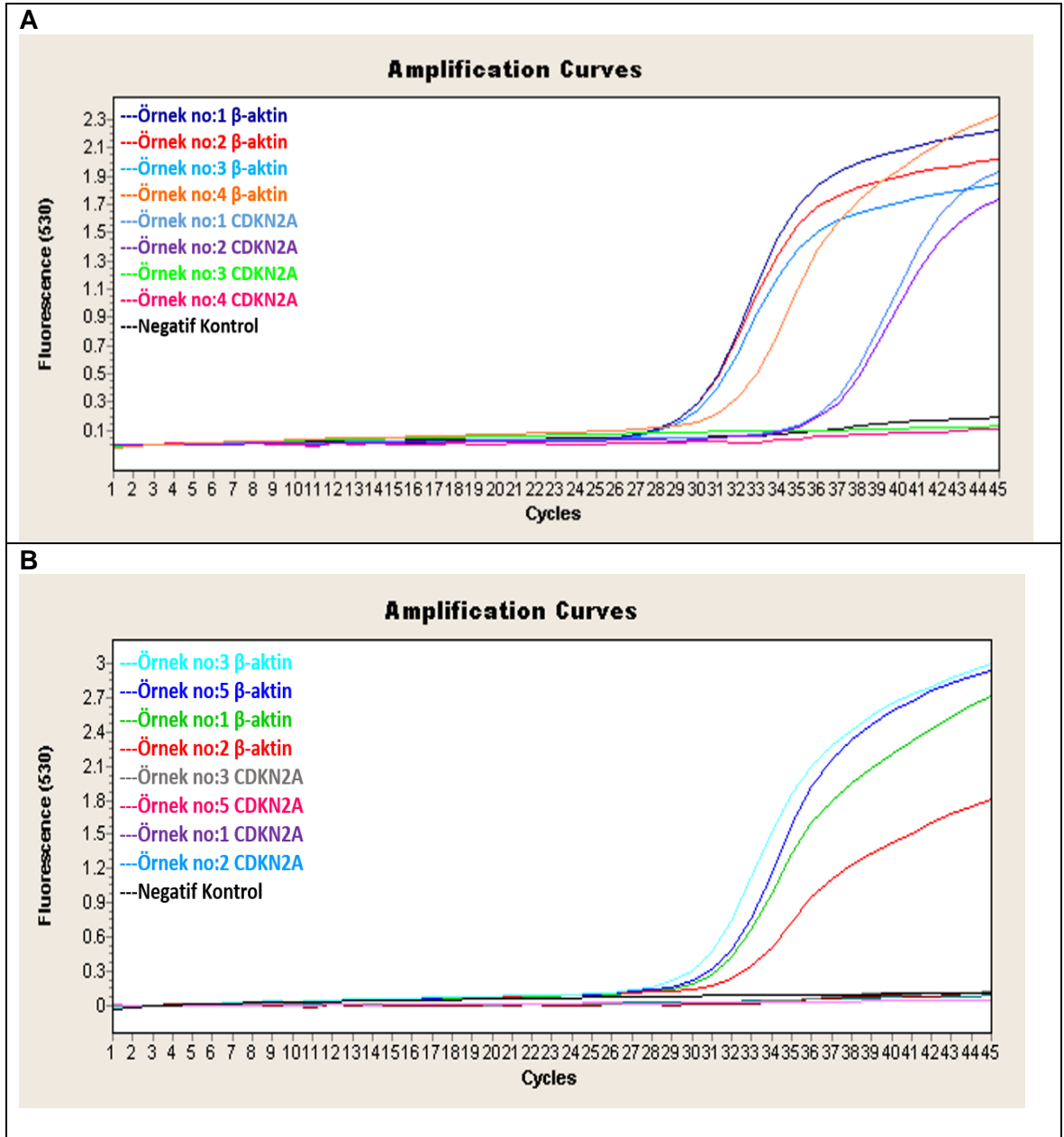
plazma eksozom örneklerinin 8'inde (%38) CDKN1B mRNA'sının varlığı belirlendi (Şekil 4.22). FFPE doku örneklerinden sadece 3'ünde (%14) CDKN2B mRNA'sının varlığı belirlenmiştir ve bu örneklerin karşılıkları olan plazma eksozom örneklerinde CDKN2B mRNA'sının varlığı belirlenmedi (Şekil 4.23). Tüm örneklerin C_T (Treshold cycle) değerleri tabloda belirtilmiştir (Tablo 4.2).



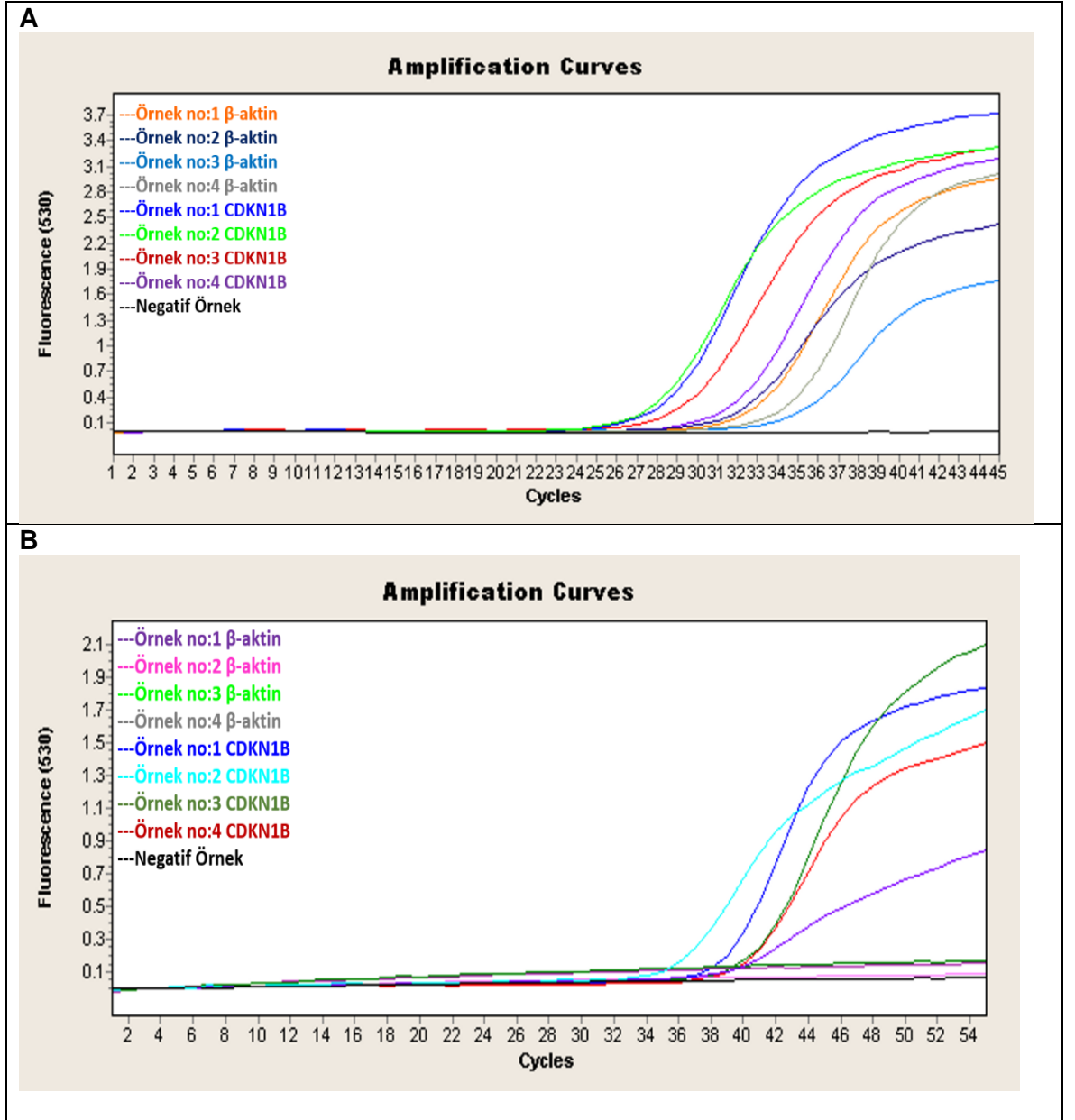
Şekil 4.19. FFPE doku (A) ve plazma eksozom (B) örneklerinde EZH2 mRNA'sının varlığı/yokluğunu gösteren amplifikasyon eğrileri (Negatif kontrol örneklerinde cDNA örneği yerine PCR-grade su kullanıldı).



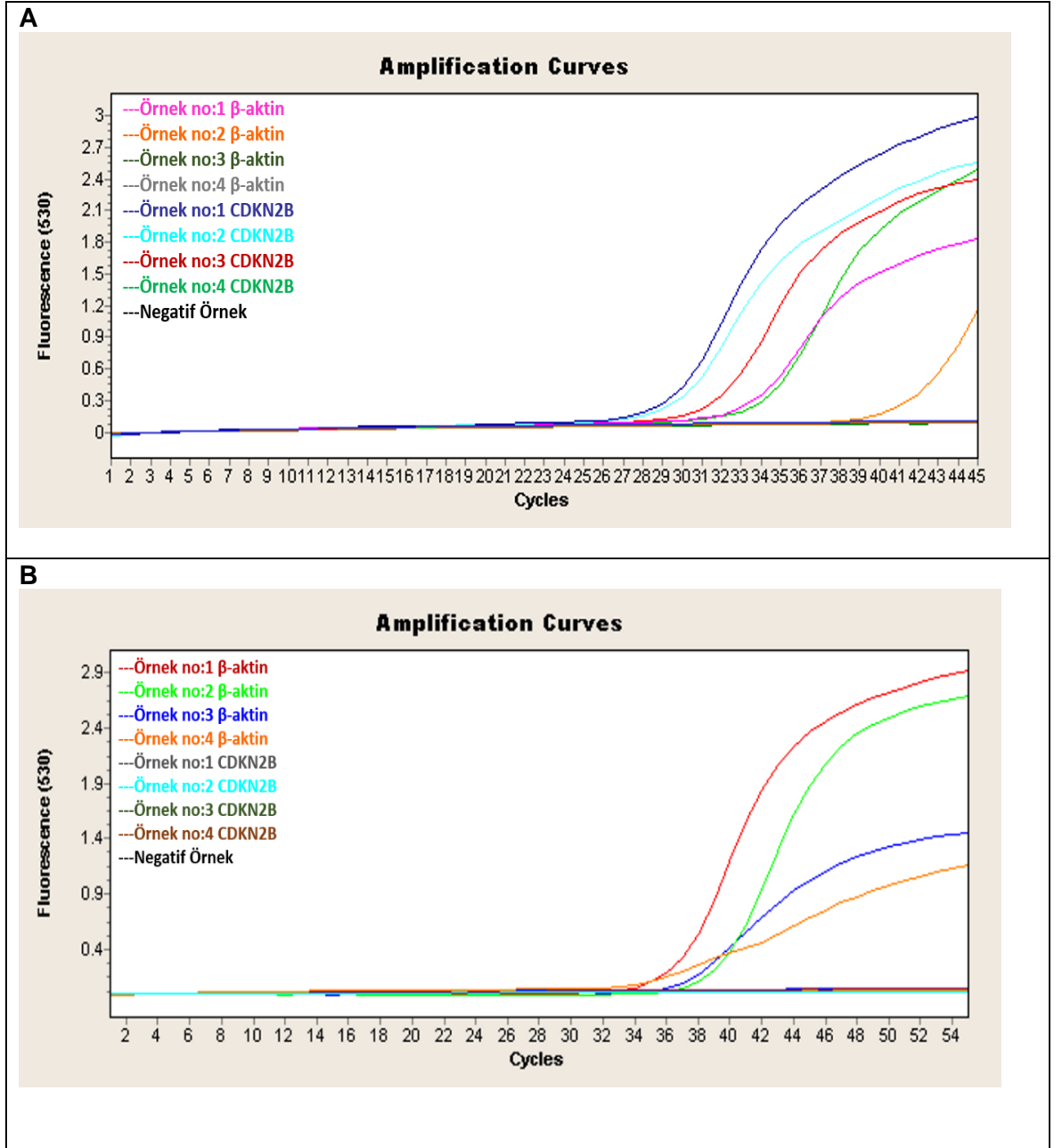
Şekil 4.20. FFPE doku (A) ve plazma ekzozom (B) örneklerinde CDKN1A mRNA'sının varlığı/yokluğunu gösteren amplifikasyon eğrileri (Negatif kontrol örneklerinde cDNA örneği yerine PCR-grade su kullanıldı).



Şekil 4.21. FFPE doku (A) ve plazma eksozom (B) örneklerinde CDKN2A mRNA'sının varlığı/yokluğunu gösteren amplifikasyon eğrileri (Negatif kontrol örneklerinde cDNA örneği yerine PCR-grade su kullanıldı).



Şekil 4.22. FFPE doku (A) ve plazma ekzozom (B) örneklerinde CDKN1B mRNA'sının varlığı/yokluğunu gösteren amplifikasyon eğrileri (Negatif kontrol örneklerinde cDNA örneği yerine PCR-grade su kullanıldı).



Şekil 4.23. FFPE doku (A) ve plazma eksozom (B) örneklerinde CDKN2B mRNA'sının varlığı/yokluğunu gösteren amplifikasyon eğrileri (Negatif kontrol örneklerinde cDNA örneği yerine PCR-grade su kullanıldı).

Tablo 4.2. Çalışmada değerlendirilen tüm örneklere ait C_T değerleri

Örnek No	EZH2		CDKN1A		CDKN1B		CDKN2A		CDKN2B	
	Ekso zom	FFPE	Ekso zom	FFPE	Ekso zom	FFPE	Ekso zom	FFPE	Ekso zom	FFPE
1	-	35,43	-	-	-	33,77	-	-	-	-
2	-	36,27	-	-	38,47	30,81	-	-	-	-
3	-	35,09	-	33,85	37,90	31,43	-	-	-	-
4	-	35,66	-	34,37	-	31,00	-	33,69	-	39,61
5	-	37,84	-	33,17	39,26	32,86	-	33,87	-	-
6	-	34,96	-	33,16	-	31,96	-	-	-	-
7	-	35,21	-	-	-	31,32	-	-	-	-
8	-	35,66	-	-	-	30,82	-	-	-	-
9	-	36,18	-	34,31	-	30,66	-	-	-	-
10	-	36,11	-	-	33,89	30,26	-	-	-	-
11	-	33,52	-	34,55	-	29,68	-	-	-	40,00
12	-	32,77	-	32,86	39,88	28,75	-	32,01	-	-
13	-	34,84	-	34,61	36,76	28,30	-	-	-	-
14	-	35,16	-	-	-	26,77	-	30,03	-	-
15	-	35,47	-	-	-	28,48	-	31,96	-	-
16	-	33,20	-	32,94	-	28,52	-	32,60	-	-
17	-	35,20	-	-	-	27,45	-	-	-	-
18	-	33,31	-	35,20	-	28,90	-	34,81	-	-
19	-	37,36	-	-	38,46	29,15	-	35,55	-	-
20	-	34,74	-	34,74	35,03	29,23	-	-	-	-
21	-	34,14	-	34,14	-	29,08	-	34,97	-	40,00

5.TARTIŞMA

Tüm vücut sıvılarımız, hücrelerden köken alan ve membranla çevrili vezikülleri içerirler ve bu ekstraselüler veziküller buldukları ortama içerikleri doğrultusunda mesaj iletirler. Ekstraselüler veziküllerin biyolojik fonksiyonlarının anlaşılmasında en önemli basamak, bu veziküllerin izolasyonunda uygulanan yöntemlerle ilgili metodolojik ilerlemedir. Bu noktada kritik basamaklar, ISEV (Uluslararası Ekstraselüler Veziküller Derneği)'in farklı çalışma grupları tarafından hazırlanan ve bu alandaki araştırmacılara yol gösterecek şekilde “minimum sağlanması gereken koşullar” alt başlığı altında yayınlanan kılavuzlarda yer almaktadır (Witwer vd 2013, Lötvall vd 2014). Bu kılavuzlarda yer alan protokoller baz alınarak modifiye edilen ve Caner ve ark. tarafından tanımlanan ultrasantrifüj-tabanlı protokol ile sağlıklı gönüllü bireylerin ve DBBHL hastalarının plazma örneklerinden başarılı bir biçimde eksozom izolasyonu yapılmıştır. Tez projesinde tanımlanan bu protokol uygulanarak, tüm örneklerden eksozom izolasyonu başarılı bir biçimde tamamlanmıştır.

Hücrel etkileşimlerin ana yöneticisi olan ve normal fizyolojik mekanizmaları lehine çeviren kanserde, eksozomlar özel bir öneme sahiptirler. Eksozom aracılığı ile tümöre yakın veya uzak bölgelere horizontal bilginin transfer edilmesi, tümörün gelişimi ve progresyonunu kolaylaştırmaktadır. Her bir eksozom köken aldığı hücrenin bir imprint'i gibidir ve nükleik asitler, proteinler, enzimler, lipidler, sitokinler gibi temel hücrel komponentleri içerirler. Eksozom biyogenezi kanserde artar ve dikkat çekici bir biçimde tümör hücreleri normal proliferasyon alan hücrelerden çok daha fazla sayıda eksozom üretirler ve salarlar. Kronik Lenfositik Lösemi (Yeh vd 2015), Hodgkin lenfoma (Eijndhoven vd 2016) gibi hematolojik neoplazmlı hastaların yanısıra meme kanseri (Galindo-Hernandez vd 2013), over kanseri (Szajnik vd 2013) gibi solid tümöre sahip hastaların plazma ve diğer vücut sıvılarında eksozom düzeylerinde anlamlı artış gözlenmektedir. Literatürle uyumlu olarak, projemizde DBBHL hastalarının plazma örneklerinde eksozom konsantrasyonunun sağlıklı kontrollere göre arttığı belirlendi. Tümör hücre kökenli eksozom salınımindaki artıştan sorumlu tutulan mekanizmaların başında, tümör mikroçevresinde baskın olan ve hipoksinin eşlik ettiği stres yer almaktadır. Bunun dışında, kanserde sıklıkla uyarılan p53 proteininin eksozom salınıminin regülasyonunda rol oynayabileceği düşünülmektedir (Whiteside vd 2016). Her ne kadar kanserin tipine ve agresifliğine bağlı olarak farklı mekanizmaların var olduğu öne sürülse de, tümör hücrelerinde eksozom salınıminin regüle eden mekanizmalar günümüze dek tam olarak açığa çıkarılamamıştır. Çalışmamızda DBBHL hastalarının plazma eksozom

konsantrasyonları, hastaların demografik verilerine göre karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte GC alt tipine sahip hastalarda plazma eksozom konsantrasyonunun Non-GC alt tipine sahip hastalarla karşılaştırıldığında daha düşük olduğu belirlendi. Bilgilerimiz dahilinde, literatürde plazma eksozom konsantrasyonunun hastalığın klinik verileri ile karşılaştırıldığında tek bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada, akciğer kanseri hastalarının plazma eksozom konsantrasyonlarının nodal tutulum ve ileri evre ile ters ilişkili olduğu bildirilmiştir (Fotinos-Ioannis D vd 2016). GC alt tipine sahip olgularda, eksozomların plazmadan çekilme nedeni bilinmemektedir ve bu nedeni bulmaya yönelik yapılacak fonksiyon çalışmalarına gereksinim vardır. Elde edilecek veriler, hiç kuşkusuz kanserin başlaması ve progresyonunun yanısıra DBBHL'nın heterojenitesi ile ilgili önemli mekanizmaların aydınlatılmasına yardımcı olacaktır.

Çalışmamızda sağlıklı bireylerin plazma örneklerinden izole edilen eksozomlardaki total proteinlerin konsantrasyonunun literatürde daha önce belirlenen konsantrasyonla uyumlu olduğu gözlemlendi (Caby vd 2005). DBBHL olgularında ise eksozomal protein miktarının sağlıklı kontrollere göre 2,3 kat daha fazla olduğu belirlendi. Literatürde çeşitli hematolojik malignansilerde bildirilmiş veriler bulunmaktadır. Örneğin, AML'li olguların serum örneklerinden izole edilen mikroveziküllerin total protein konsantrasyonunun, sağlıklı bireylere göre yaklaşık 60 kat daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Szczepanski vd 2011). Benzer şekilde bir solid tümör örneği olan küçük hücre dışı akciğer kanserli hastaların plazma örneklerinden izole edilen eksozomların protein konsantrasyonlarının, sağlıklı bireylerden izole edilen eksozomlara oranla 3,9 kat daha fazla olduğu rapor edilmiştir (He vd 2014). Çalışmamızda eksozom konsantrasyonu ile total protein konsantrasyonunun korele olmadığı belirlenmişti. Eksozomların içerdikleri proteinlerin identifikasyonları proje hedefimiz değildi, ancak bu sonuçlar bize eksozomların özgün bir biçimde belli proteinleri içerdiklerini ve bu özgün proteinler nedeniyle de hastalığın patogeneze katılabileceklerini düşündürmektedir. Total protein konsantrasyonunda artışın yanısıra, sıvı biyopsi materyali olarak eksozomların protein içeriklerinin identifikasyonunun önemli avantajları da bulunmaktadır. Kanda bulunan proteinlerle karşılaştırıldıklarında daha konsantre olmaları ve daha stabil olmaları (eksternal proteazlardan korunmaları) nedeniyle, tümör kökenli eksozomal proteinler, kanserin erken tanısının yanısıra progresyonunun ve tedavi yanıtının değerlendirilmesinde önemli aday belirteçler olarak değerlendirilebilirler.

Çalışmamızda izole edilen tüm eksozom örneklerinin CD63 (tetraspanin), CD81 (tetraspanin) ve TSG101 (eksozom membranına bağlanan protein) proteinlerini

taşıdıkları, ancak hücre iskeleti proteini olan β -aktin açısından heterojen oldukları saptandı. β -aktin negatif eksozomların varlığı, eksozom izolasyonunda selüler debris kontaminasyonunun olmadığı bir göstegesini olarak izolasyon protokolünün başarısını da yansıtmaktadır (Le vd 2017). Literatürde, kolon kanseri ve triple-negatif meme kanseri gibi tümör kökenli hücrelerden salınan eksozomların da β -aktin taşıma durumlarına göre heterojen oldukları rapor edilmiştir (Le vd 2017, McCready vd 2010). Hücre tipine göre salınan eksozomların belirteçleri hakkında bilgi içeren ExoCarta veritabanında da belli hücrelerden salınan eksozomların β -aktin içerdikleri yer almaktadır (http://exocarta.org/gene_summary?gene_id=11461). Tüm bu sonuçlar bize, DBBHL örneğinde olduğu gibi eksozomların hücre tipine ve vücut sıvısı tipine bağlı olarak farklı makromolekülleri taşıdıklarını ve bu farklılığa bağlı olarak heterojenite gösterdiklerini kanıtlamaktadır.

Moleküler profilleri benzerlik gösterse de, eksozomların veziküler ve membran içerikleri tam anlamıyla köken aldığı hücrenin birebir aynısı değildir. Tümör-kökenli eksozomlar da kısmen köken aldıkları hücreye ait moleküler izleri taşırlar ve bu moleküler iz, farklı tümör hücreleri tarafından üretilen eksozomları birbirinden ayırmanın yanı sıra tümör-kökenli eksozomları malign-olmayan hücrelerden salınan eksozomlardan da ayırt eder (Whiteside 2016). Dolaşımda varolan eksozomlar; (a) malign hücrelerden salınan, (b) tümör-kökenli eksozomlar tarafından uyarılan komşu non-malign hücrelerden salınan, (c) kanserle ilişkili mediatörler tarafından uyarılan sağlıklı hücrelerden salınan ve (d) kanserle ilişkili immun hücrelerden salınan eksozomları içermektedir. Bu hücrelerin herbirinden salınan eksozomlara özgün belirteçlerin henüz bilinmiyor olması nedeniyle hedef eksozomların özgün olarak tanımlanamaması, dolaşımda var olan tümör-kökenli eksozomlarla ilgili araştırmalarda karşılaşılan temel zorluktur. Ancak; büyüklükleri, konsantrasyonlarındaki artış ve tümör mikroçevresindeki artmış permeabilite ve rensiyon (EPR) etkisi nedeniyle, sirkülasyondaki eksozomlar tümör-kökenli eksozomlar olarak değerlendirilmelerini olanaklı kılmaktadır. Bununla birlikte, konu ile ilgili detaylı verilerin birikimi ve teknolojik ilerlemelere paralel olarak, yakın gelecekte tümör-kökenli eksozomların buldukları ortamdan saf olarak izole edilmeleri beklenebilir.

B-hücre lenfomalarının büyük bir bölümü, T-hücre bağımlı antijenik uyarımı takiben humoral immun yanıtı oluşturan germinal merkez (GC) B-hücrelerinden köken alırlar. GC B-hücreleri, somatik hipermutasyon sürecinde son derece hızlı replike olma yeteneğine sahip özel hücrelerdir. Somatik hipermutasyon sürecinde DNA hasarını algılama noktalarının ve replikasyon kontrol noktalarının zayıflatılması gerekmektedir. DNA hasar

yanıtının zayıflatılmasına ek olarak somatik hipermutasyon süreci, bu hücrelerde onkogenik değişimlerin oluşma riskini artırır ve sonuçta DBBHL gelişimine yol açar. Bu süreci detaylı olarak inceleyecek olursak, antijenik uyarımla aktive olduktan sonra GC B-hücrelerinde *EZH2* eksprese olmaya başlar. B-hücre farklılaşmasının en erken dönemlerinde kontrollü knockout çalışmaları, *EZH2*'nin pre-B hücrelerinde normal immünoglobulin VDJ rekombinasyonu için önemli olduğunu göstermiştir. Ancak pre-B-hücresi aşamasından sonra *EZH2* ekspresyonu azalır ve lenfoid doku içinde lokalize olgun B-hücrelerinde *EZH2* ekspresyonu belirlenmez. Ancak, GC oluşumuna katılan B-hücrelerinde *EZH2* ekspresyonu tekrar gözlenir ve bu hücreler GC'den çıktıktan sonra tekrar *EZH2* ekspresyonu azalır (Su vd 2003, Velichutina vd 2010). Tüm bu sonuçlar bize GC'lerin oluşumu için *EZH2*'ye gereksinim olduğunu göstermektedir. Birçok çalışma DBBHL'da *EZH2* ekspresyonu rapor etmiştir. 2015 yılında B-hücre lenfomaları ile yapılan bir çalışmada, mikroarray analizi sonucunda *EZH2*'nin hücre orijininden bağımsız tüm DBBHL hastalarında eksprese olduğu ve aynı zamanda *EZH2*'nin ekspresyon düzeyinin Folliküler Lenfoma ve Mantle Hücreli Lenfoma hastalarından daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Zhou vd 2015). Kanada'da 2013 yılında 69 de novo DBBHL hastasının tümünde *EZH2* ekspresyonu tanımlanmıştır (Beguelin vd 2013). Çalışmamızda literatürde yer alan bu verilerle uyumlu olarak tüm tümör doku örneklerinde *EZH2*'nin eksprese olduğu belirlendi. Ancak, tümör doku örneklerinin alındığı hastaların eksozom örneklerinde *EZH2* mRNA'sına rastlanmadı ve *EZH2* ekspresyonu açısından eksozomal içeriğin primer tümörle uyumlu olmadığı saptandı. *EZH2*'nin aşırı ekspresyonu prostat, meme ve gastrointestinal sistem kanserleri gibi solid tümörlerde tanımlanmıştır ve sıklıkla tümörün agresif özelliği ve kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (Chase ve Cross 2011). Hematolojik malignensilerde, *EZH2*'nin aşırı ekspresyonu tıpkı solid tümörlerde olduğu gibi B-hücre lenfomalarının ve T/NK-hücre lenfomalarının agresif varyantlarında görülen ortak bir değişimdir. *EZH2* aşırı ekspresyonunun büyük bir bölümünden fonksiyon kazanım mutasyonları sorumludur. DBBHL'da tanımlanan ve *EZH2* aşırı ekspresyonundan sorumlu fonksiyon kazanım mutasyonu (heterozigot), izoform C'de ekson 15'de tirozin 641(Y641)'in (izoform A'da Y646) sıklıkla fenilalanin (F), asparajin (N) ve daha az sıklıkta histidin (H) veya serin (S)'ye dönüşmesidir. DBBHL'da GCB-benzeri immunofenotipe sahip olgularının yaklaşık %20'sinde *EZH2* mutant tümör hücrelerinin varlığının bildirilmesine karşın, bazı çalışmalarda sözkonusu mutasyonun varlığı saptanmamıştır ve bu konuda tam bir consensus sağlanmış değildir (Schmitz vd 2018, Çetin vd 2016). Wild-tip *EZH2*; H3K27'nin mono- ve di-metilasyonunu katalizlerken, mutant *EZH2* çok daha etkin bir biçimde H3K27'nin tri-metilasyonunu katalizler ve böylelikle lenfomageneze katılır (Sneeringer vd 2010). Çalışmamızda DBBHL hastalarının tümör doku örneklerinde *EZH2* aşırı ekspresyonu saptanmamakla

birlikte, Y641 fonksiyon kazanım mutasyonu da belirlenmedi. Bu veriler, yukarıda detayları ile tartıştığımız literatürlerle uyumludur.

Çalışmamızın ana bulgularından biri de eksozomların RNA içerikleri ile karşılaştırıldığında son derece düşük konsantrasyonda DNA içerdikleridir. DBBHL hücrelerinden salınan eksozomların önemli RNA moleküllerinin içerdikleri bilinmektedir. Almanya'ya yapılan bir çalışmada DBBHL'nın "side population" (kök hücre benzeri hücre popülasyonu) ve "non-side population" hücreler olmak üzere 2 farklı grup hücrelerden oluştuğunu ve bu iki hücre dengesinin hücreler arasında Wnt sinyallerinin yer değiştirmesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Side population hücrelerden izole edilen eksozomların yüksek konsantrasyonda Wnt3a RNA'sını içerdikleri gösterilmiş ve iki hücre grubu arasındaki bilgi alışverişinden eksozomlar sorumlu tutulmuştur. Bu çalışma DBBHL'da eksozomların tümör heterojenitesinin oluşmasında bir modülatör olarak görev yapabileceğini düşündürmesi açısından son derece önemlidir (Raphael vd 2014). Beş farklı DBBHL hücre hatları kullanılarak yapılan bir başka çalışmada, hücre hatları kökenli ekstraselüler veziküllerin köken aldıkları hücre orijinine ile ilişkili yüzey antijenlerini taşımalarının yanısıra transkriptom analizi sonrasında ekspresyon profillerinin birbirleri ile oldukça sıkı korele olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada dikkat çekici önemli bir nokta da, ekstraselüler veziküllerin bol miktarda ve stabil RNA moleküllerini içermeleri nedeni ile köken aldıkları hücrenin mutasyonel durumu hakkında veziküllerin bilgi taşıyıp taşımadıklarının belirlenmesi amacı ile RNA dizi analizinin yapılmasıdır. Sonuçta 79 adet mutasyonun 71 tanesinin ekstraselüler veziküllerde de bulunduğu belirlenmiştir (Rutherford vd 2018). DBBHL hastalarından izole edilen eksozom örneklerinin DNA içerikleri ile ilgili bilgilerimiz dahilinde bir çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmada eksozomların DNA içermedikleri rapor edilmiştir (Sarah vd 2014). Çalışmamız DBBHL hastalarının plazma eksozom örneklerinde DNA'nın varlığını gösteren ilk çalışma olması nedeni ile de orijinallik taşımaktadır. Ancak, total RNA konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında, eksozomal DNA konsantrasyonunun son derece düşüktür. Düşük konsantrasyonlarda izole edilen DNA örnekleri projemizin asıl hedefi olan primer tümör DNA'sı ve eksozomal DNA arasındaki metilasyon profillerinin uyumluluklarının belirlenmesi amacı ile kullanıldı.

Her ne kadar sinyal molekülleri, epigenetik düzenleyiciler gibi protein ve RNA moleküllerini içerseler de, eksozomların bir başka iletişim tarzı da içerdikleri DNA molekülleri aracılığıyla. Eksozomların kromozomal DNA ve mitokondriyal DNA'yı barındırdıkları bilinmektedir. Eksozomlardaki kromozomal DNA, hücre kültürü süpernatantında olduğu gibi kan, seminal sıvı ve idrar dahil olmak üzere insan ve fare biyolojik sıvılarında da belirlenmiştir. İlginç olan, DNA'nın eksozomlar içinde

paketlenmesinin, dolaşımdaki cell-free DNA'ya göre stabilite kazandırabilmesidir (Speicher ve Pantel 2014, Jin et al. 2016). Bu bulgu, kanser hastalarının tanısı ve hastalığın izlenmesini kolaylaştırmak için sıvı biyopsi olarak kullanılmak üzere eksozomal DNA'ya özel bir ilginin de başlamasına neden olmuştur (Wan vd 2017, Yi vd 2017). Bu alanda yapılacak çalışmaların önceliğini de sirkülasyondaki tümör-kökenli eksozomların zenginleştirilerek saf halde elde edilmeleri ve tümöre-özgün DNA izolasyon aşamasına geçilmesi olacaktır.

Tüm genom dizileme kullanılarak, pankreas kanseri hastalarının dolaşımdaki eksozomlarında büyük fragmanlı (>10 kb) çift-iplikli DNA'nın varlığı tanımlanmıştır ve bu DNA'nın nükleer genomik DNA'yı andıracak şekilde tüm kromozomlara ait fragmanları içerdikleri gösterilmiştir (Kahlert vd 2014). Eksozomal DNA, baskın bir biçimde dsDNA fragmanlarından oluşmaktadır (Thakur vd 2014, Kalluri vd 2016, Wang vd 2018). Çalışmamızda literatürle uyumlu olacak şekilde DBBHL hastalarının dolaşımdaki eksozom örneklerinde dsDNA'nın varlığı gösterildi. Eksozomal DNA'nın, köken aldığı hücrelerinin genomik DNA'sı ile uyumu bir başka önemli araştırma alanıdır. Pankreas kanserli hastaların eksozomal DNA içeriklerini araştıran çalışmalarda, eksozomal DNA'da *TP53* ve *KRAS* mutasyonlarının varlığı gösterilmiş. Ancak, *KRAS* mutasyonunun sağlıklı bireylerin eksozomal DNA'sında da saptanması, bu parametrenin tanı amaçlı kullanımını son derece kısıtlamıştır (Allenson vd 2017, Yang S vd 2017). Bu çalışmaların özelinde, eksozomal içeriğin kanser tanısı, progresyonu veya tedaviye yanıtın izlenmesinde kullanımını hedefleyen çalışmaların son derece özenle dizayn edilmelerinin gerekliliği vurgulanabilir.

Yukarıda da belirtildiği üzere, hücre kültürü süpernatantlarında ve vücut sıvılarında farklı tipte ve farklı büyüklükte DNA molekülleri (ssDNA, dsDNA, mitokondriyal DNA) bulunabilmektedir. Eksozom içinde en fazla miktarda bulunan DNA molekülü, dsDNA'dır. Aynı zamanda DNA molekülü serbest halde veya kromatine bağlı olarak da bulunabilmektedir (Kalluri vd 2016). Kanserde DNA tamir mekanizmasındaki deregülasyonun kanser hücrelerinde sitozolik DNA birikimine neden olduğu bilinmektedir. Literatürdeki güncel verilere dayanılarak, bu durum kanserli bireylerden izole edilen eksozomlarda DNA'nın varlığını açıklayabilen en iyi mekanizmadır. Aynı zamanda, farklı hücre tiplerinde sitozolik nükleazların farklı konsantrasyonda bulunmasının da, bu durumdan sorumlu olabileceği değerlendirilmiştir (Shen vd 2015, Ho vd 2016). Ancak DNA'nın eksozoma paketlenmesi ile ilgili ve hedef hücredeki etkisi ile ilgili bilgilerimiz son derece sınırlıdır. Köken aldığı hücreyi etkileyen eksojen ajanların da DNA paketlenmesinden sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Alıcı hücrede eksozomal DNA'nın etkisi ise, alıcı hücrede varolan genomik stres faktörlerinin varlığına

ve alıcı hücrenin mikroçevresinde bulunan stres faktörlerine bağlı olabileceği düşünülmektedir.

EZH2'nin hedef genlerine odaklandığımızda, *EZH2*'nin en azından *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN2A* veya *CDKN2B* gibi hücre döngüsü kontrol genlerinin baskılayarak GC oluşumuna katıldığı bilinmektedir (Beguelin vd 2013, Caganova vd 2013). Literatürde *CDKN1A* özelinde eksozomal RNA içerikleri ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunurken, DNA içeriği ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Kolorektal kanser hücre hattı kullanılarak yapılan bir çalışmada, kolorektal kanser hücreleri ve bu hücrelerden köken alan eksozomların mikroarray yöntemi ile whole transkriptom analizleri yapılmıştır. Hücrelerde toplam 1.461 genin aşırı eksprese olduğu ve bu genlerden sadece 241 tanesinin mikroveziküllerde (ultrasantrifüj sonrası) var olduğu saptanmış olup, bu genler arasında hücre döngüsünün kontrolünde rol oynayan 20 adet genin varlığı belirlenmiştir. Bu 20 gen arasında *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN2A* ve *CDKN2B* yer almaktadır (Hong vd 2009). Glioblastom multiforme tanısı alan hastaların beyin tümör doku örnekleri kullanılarak hazırlanan primer hücre kültürleri ve bu hücrelerden salınan mikroveziküllerin (ultrasantrifüj sonrası) whole transkriptom analizleri sonucunda, mikroveziküllerde 4.700 farklı mRNA'nın varlığı belirlenmiş olup, 498 mRNA'nın hücre proliferasyonunda rol oynayan genlere ait oldukları belirlenmiştir. Bu genler arasında *CDKN1A* yer almaktadır (Skog vd 2008). Glioblastomla ilgili bir diğer çalışma da hücre hatları kullanılarak yapılmış olup, primer glioblastom multiforme hücrelerinden köken alan eksozomlarda *CDKN1A* mRNA'sının varlığı saptanmıştır (Bolukbasi vd 2012). Aynı çalışmada malin melanom hücre hatlarından köken alan eksozomlarda da *CDKN1A* mRNA'sının varlığı gözlenmiştir. Literatürde eksozomların *CDKN1A* mRNA'sını içerdiklerini gösteren bu çalışmaların tümü solid tümör hücre hatları kullanılarak tamamlanmıştır ve bilgilerimiz dahilinde klinik örnekler kullanılarak yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda, tümör-kökenli eksozomların *CDKN1A* geninin unmetile DNA'sını içerdikleri ancak transkriptini içermedikleri saptandı. Bir başka ifade ile DBBHL hastalarında *CDKN1A* mRNA'sının eksozoma paketlenmesinin tercih edilmediği gösterildi. Literatürle uyumsuz bu verilerin olası nedeni, hematolojik malignansilerde *CDKN1A*'nın solid tümörlerden farklı bir mekanizma ile karsinogenez sürecinde rol oynayabileceği olabilir.

Çalışmamızda hedeflenen diğer genlerle ilgili çalışmalar, çoğunlukla protein düzeyindeki varlıkları ve tümör doku örnekleri ile ilgilidir. Bu nedenle karşılaştırmalarımız bu veriler üzerinden olacaktır. *CDKN1B*, siklin E-CDK2 yada siklin D-CDK4 kompleksinin aktivasyonunu engelleyerek hücre döngüsü progresyonunun G1 evresinde kontrolünü sağlar. Temel fonksiyonu hücre döngüsünü durdurmak yada yavaşlatmak olduğu için

'hücre döngüsü inhibitörü' olarak da ifade edilir (Roy A vd 2015). Ayrıca *CDKN1B* ortam koşullarına göre hücre sağkalımını ve apoptozu da düzenlemektedir. Sitoplazmik *CDKN1B*'nin AML'de kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Min et al., 2004). *CDKN1B* uzun bir süre boyunca sadece bir hücre döngüsü düzenleyicisi olarak düşünülmüş ve dolayısıyla lösemi ve diğer malignitelerdeki işlevi klasik olarak tümör baskılayıcı özelliklerine dayandırılmıştır. *CDKN1B* klasik olarak tümör baskılayıcı olarak kabul edilmesine rağmen, son araştırmalar *CDKN1B*'nin onkogenik özelliğinin de olabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla *CDKN1B* hem bir tümör baskılayıcı hem de potansiyel bir onkogen olarak tanımlanmaktadır (Roy vd 2015). Haferlach ve arkadaşları AML hastalarında yüksek *CDKN1B* ekspresyonunu kötü bir prognostik marker olarak tanımlamışlardır. İleri yaş AML hastalarında daha yüksek *CDKN1B* ekspresyonu görmüşlerdir. Aynı zamanda yüksek *CDKN1B* ekspresyonunu daha kısa toplam sağkalım ve progresyonsuz sağkalım oranıyla da ilişkili bulmuşlardır ve *CDKN1B*'nin AML hastalarında bir prognostik biyobelirteç olabileceğini önermişlerdir (Haferlach vd 2011). Çalışmamızda DBBHL hastalarının tümör doku örneklerinin tümünde *CDKN1B* ekspresyonunu belirledik ve %38 oranında uyumlu, plazma eksozom örneklerinde de *CDKN1B* mRNA'sı belirlendi. Bilgilerimiz dahilinde başta hematolojik malignensiler olmak üzere solid tümörlerde sirkülasyondaki eksozomların *CDKN1B* transkriptini taşıdıkları ilk kez bu çalışmada gösterilmiş olup, projemiz bu açıdan da orijinal nitelik taşımaktadır. DBBHL'de eksozomlara *CDKN1B* transkriptinin tercihli olarak paketlenmesinden sorumlu mekanizmalar ve bu transkripti içeren eksozomların hastalığın heterojentesinden ve patogenezinin sorumlu olup olmadığı bir sonraki projelerimizin hedeflerinden olacaktır.

Çalışmamızda, DBBHL hastalarının tümör doku örnekleri ile karşılıklı olan eksozom örneklerinde *CDKN2A* metile DNA'nın varlığı açısından %91 uyum saptandı. Uyum saptanmayan 2 hastadan bir hastanın evre I ve diğer hastanın evre II hastası oldukları saptandı. *CDKN2A* metilasyonunun indolent (yavaş seyirli) lenfomalara göre agresif lenfomalarda daha yaygın olduğu bildirilmiştir ve bir matür B-hücre lenfoması olan foliküler lenfoma örneklerinin % 52'sinde metile *CDKN2A* geninin varlığı saptanmıştır. (Hayslip vd 2006, Chim vd 2007). Çalışmada *CDKN2A*'nın inaktive edilmesinden başlıca DNA metilasyonu sorumlu tutulmuş ve bu epigenetik mekanizmanın transformasyonda ve tümör progresyonunda önemli bir mekanizma olduğu öngörülmüştür.

CDKN2A geninin sessizleşmesinden homozigot delesyonlar ve oldukça nadir gözlenen mutasyonlara ek olarak promoter hipermetilasyonu sorumludur. DBBHL'da uzun bir süredir *CDKN2A* promoter hipermetilasyonunun patogenezinin ve progresyondan sorumlu önemli bir mekanizma olduğu bilinmektedir. Literatürde

CDKN2A promoter hipermetilasyonunun görülme sıklıklarının %16-75 arasında değiştiği yer almaktadır. İleri evre ve orta/yüksek risk IPI skoruna sahip hastalarda *CDKN2A* hipermetilasyon sıklığının daha yüksek olduğunu bildiren çalışmaların yanısıra (Amara vd 2008, Shiozawa vd 2006), *CDKN2A* hipermetilasyon düzeyi ile hastaların klinik evreleri ve IPI skorları arasında anlamlı bir ilişki bulmayan çalışmalar da bulunmaktadır (Zainuddin vd 2011). Çalışmamızda, DBBHL hastalarının tümör doku örneklerinde *CDKN2A* hipermetilasyonun görülme sıklığı, literatürde tanımlanan sıklıktan daha yüksektir. Bunun olası bir nedeni, yukarıda da tartışıldığı üzere, hasta grubumuzun büyük bir bölümünün ileri evre olgular olması olabilir. *CDKN2A* promoter hipermetilasyonu, hem mRNA hem de protein düzeyinde ekspresyonunun baskılanmasına neden olmaktadır (Klangby vd 1998). Ancak, *CDKN2A* ve *CDKN2B* metilasyonunun her zaman bu genlerin ekspresyonunu baskılamakta yeterli olmadığı da bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Krajnović vd 2014). Literatürle uyumlu olarak, çalışmamızda tümör dokularında *CDKN2A* metilasyonu saptanan örneklerin %45'inde *CDKN2A* transkriptini varlığı gözlenmiştir (β -aktine göre relative olarak ekspresyon artışı saptanmamakla birlikte). DBBHL olgulardan elde edilen plazma eksozom örneklerinde de *CDKN2A* transkriptinin varlığı gözlenmemiştir. Tüm bu sonuçlar bize, metile *CDKN2A* DNA'sının eksozoma paketlenmesinin tercih edildiğini, ancak transkript düzeyinde eksozoma paketlenmenin tercih edilmediğini göstermektedir. Aynı zamanda, literatürde ilk kez plazma eksozomlarında metile *CDKN2A* DNA'sının varlığı gösterilmiş olup, bu profilin primer tümör doku örnekleri ile uyumlu olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda bu sonuç bize *EZH2*'nin *CDKN2A* metilasyonu üzerinde rolü olabileceğini ve metile *CDKN2A*'nın lenfomagenez sürecine katılabileceğini düşündürmektedir.

CDKN2B promotor bölgesi hipermetilasyonu solid tümörlerin aksine hemen hemen tüm hematolojik malignansilerde tanımlanmıştır. Lenfomalarda *CDKN2B* ile ilgili genetik ve epigenetik çalışmalar, *CDKN2B*'de homozigot delesyon ve mutasyon oranının oldukça düşük olduğunu, ancak bu genin sıklıkla hipermetile olduğunu tanımlamışlardır (Otsuki vd 1995, Drexler vd 1998). Baur ve arkadaşları B-hücreli lenfomalarda 47 hastanın 30'unda (%64) *CDKN2B* metilasyonu belirlemişlerdir. Ayrıca 9 T-hücreli lenfoma hastasının 4'ünde (%44) de *CDKN2B* metilasyonu belirlemişlerdir. Bu genin T-hücreli lenfomalara oranla B-hücreli lenfomalarda sıklıkla inaktive olması, bu genin B-hücreli lenfomalarda daha önemli olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca aynı çalışmada *CDKN2B* metilasyonu görülen tüm olgularda *CDKN2A* metilasyonu da görülmüştür (Baur vd 1994). Amara ve arkadaşları ise DBBHL hastalarının %41'inde *CDKN2B* promotor metilasyonu belirlenmişlerdir (Amara vd 2008). Krajnovic ve arkadaşları da 51 DBBHL hastasının 12'sinde (%23) *CDKN2B* hipermetilasyonu görmüşlerdir (Krajnović vd 2014).

Son yıllarda yapılan bir çalışmada, Chambwe ve arkadaşları DBBHL hastalarında epigenetik değişimleri array tabanlı yöntemle incelemişler ve 6 epigenetik alt sınıf tanımlamışlardır. Bu sınıflardan sadece biri haricinde diğer tüm sınıflarda *CDKN2B*'yi hipermetile bulmuşlardır. Bu sonuç *CDKN2B* hipermetilasyonunun lenfomagenezin erken döneminde gerçekleştiğini düşündürmektedir (Chambwe vd 2014). Çalışmamızda DBBHL hastalarının plazma eksozomlarının tümünün primer tümörle uyumlu olarak metile *CDKN2B* DNA'sını içerdiklerini gösterdik. Bir başka ifade ile, çalışmamızın bulguları metile *CDKN2A* DNA'sının eksozoma paketlenmesinin tercih edildiğini, ancak transkript düzeyinde eksozoma paketlenmenin tercih edilmediğini göstermektedir. Aynı zamanda, literatürde ilk kez plazma eksozomlarında metile *CDKN2A* DNA'sının varlığı gösterilmiş olup, bu profilin primer tümör doku örnekleri ile uyumlu olduğu gösterilmiştir. Sonuçta, *EZH2*'nin *CDKN2B* metilasyonu üzerinde rolü olabileceğini ve metile *CDKN2B*'nin lenfomagenez sürecine katılabileceğini düşünmekteyiz. Yukarıda da tartışıldığı üzere, *CDKN2A* ve *CDKN2B* metilasyonları DLBCL, Burkitt's Lenfoma ve T-hücre Akut Lenfoma gibi hematolojik malignensilerde sıklıkla rastlanan epigenetik değişimlerdir (Herman vd 1997, Shiozawa vd 2006, Guney vd 2012). Bu amaçla yapılan çalışmaların ortak sonuçlarından biri de, bu iki gen özelinde farklı hematolojik malignensilerde farklı metilasyon profillerinin varlığıdır. Tüm bu verilerin yanısıra, çalışmamızda DBBHL hastalarının plazma eksozomlarının primer tümör dokularıyla uyumlu şekilde hem *CDKN2A* hem de *CDKN2B* metile DNA'sını tercihli olarak paketlediklerinin gösterilmesi, *CDKN2A* ve *CDKN2B*'nin DBBHL patogenezinde dual metilasyon belirteci olabileceğini ve non-invaziv yöntemle, eksozomların bu dual metilasyon belirtecinin varlığını araştırmak açısından uygun bir biyomarker olabileceğini düşündürmektedir. Aynı zamanda bu çalışmalardan elde edilecek veriler, DBBHL'nin tanısı ve prognozunun değerlendirilmesinde likit biyopsi olarak plazma eksozom örneklerinin klinik uygulamada kullanılabilirliklerinin anlaşılmasına yardımcı olacaktır. Bu konuda daha geniş serilerde ve daha detaylı araştırmaların yapılmasına gereksinim vardır.

6. SONUÇ:

Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma'da eksozomal ve nükleer DNA metilasyon paternlerinin karşılaştırılmasını hedefleyen araştırmamızda sonuç olarak;

1. Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldıklarında, DBBHL hastalarının plazma eksozom konsantrasyonlarında anlamlı artış gözlemlendi. Ayrıca, izole edilen eksozomların da içerikleri açısından heterojenite gösterdikleri belirlendi.

2. DBBHL hastalarının plazmalarından izole edilen eksozom örnekleri çift iplikli ve fragmente DNA'yı içerdiği AFM ile gösterildi. Çalışmamız literatürde DBBHL hastalarının plazma eksozom örneklerinde DNA'nın varlığını tanımlayan ilk çalışmadır.

3. Plazma eksozom örnekleri DNA konsantrasyonunun, içerdikleri total RNA konsantrasyonundan daha düşük konsantrasyonda olduğu belirlendi.

4. *CDKN1A* geni özelinde; tümör hücre nükleer DNA'ları ile eksozomal DNA'ların aynı metilasyon profiline sahip olduğu belirlendi. *CDKN1A* geni unmetile DNA'sının tercihli olarak eksozomlara paketledikleri gösterildi. Çalışmamız, literatürde DBBHL hastalarının plazma eksozom örneklerinde *CDKN1A* unmetile DNA'sının varlığını tanımlayan ilk çalışmadır.

CDKN1A geni özelinde; tümör hücre RNA'ları ile eksozomal RNA'ların aynı ekspresyon profiline sahip olmadıkları ve bu transkriptin eksozomlara paketlenmesinin tercih edilmediği gösterildi.

5. *CDKN1B* geni özelinde; tümör hücre nükleer DNA'ları ile eksozomal DNA'ların aynı metilasyon profiline sahip olduğu belirlendi. *CDKN1B* geni unmetile DNA'sının tercihli olarak eksozomlara paketledikleri gösterildi.

CDKN1B geni özelinde; tümör hücre RNA'ları ile eksozomal RNA'ların varlığı arasında %38 oranında uyum gözlemlendi. Eksozomlarında *CDKN1B* transkriptine sahip hastaların tümünün Non-GC alt tipinde idi. Çalışmamız, literatürde DBBHL hastalarının plazma eksozom örneklerinde *CDKN1B* unmetile DNA'sının ve transkriptinin varlığını tanımlayan ilk çalışmadır.

6. *CDKN2A* geni özelinde; tümör hücre nükleer DNA'ları ile eksozomal DNA'ların %91 oranında aynı metilasyon profiline sahip oldukları belirlendi. DBBHL hücrelerinin tercihli

olarak *CDKN2A* geni metile DNA'sını eksozomlara paketledikleri gösterildi. Çalışmamız, literatürde DBBHL hastalarının plazma eksozom örneklerinde *CDKN2A* metile DNA'sının varlığını tanımlayan ilk çalışmadır.

CDKN2A geni özelinde; tümör hücre RNA'ları ile eksozomal RNA'ların aynı ekspresyon profiline sahip olmadıkları ve bu transkriptin eksozomlara paketlenmesinin tercih edilmediği gösterildi.

7. *CDKN2B* geni özelinde; tümör hücre nükleer DNA'ları ile eksozomal DNA'ların aynı metilasyon profiline sahip oldukları belirlendi. DBBHL hücrelerinin tercihi olarak *CDKN2B* geni metile DNA'sını eksozomlara paketledikleri gösterildi. Çalışmamız, literatürde DBBHL hastalarının plazma eksozom örneklerinde *CDKN2B* metile DNA'sının varlığını tanımlayan ilk çalışmadır.

CDKN2B geni özelinde; tümör hücre RNA'ları ile eksozomal RNA'ların aynı ekspresyon profiline sahip olmadıkları ve bu transkriptin eksozomlara paketlenmesinin tercih edilmediği gösterildi.

8. Primer tümörle uyumlu olarak, tüm eksozomal DNA'ların *EZH2* mutasyonuna sahip olmadıkları belirlendi.

7.KAYNAKLAR

Allenson K, Castillo J, San Lucas F A, Scelo G, Kim D U, Bernard V, Davis G, Kumar T, Katz M, Overman M J. High prevalence of mutant KRAS in circulating exosome-derived DNA from early stage pancreatic cancer patients. **Ann Oncol** 2017; 28 (4): 741-747.

Amara K, Trimeche M, Ziadi S, Laatiri A, Hachana M, Korbi S. Prognostic significance of aberrant promoter hypermethylation of CpG islands in patients with diffuse large B-cell lymphomas. **Ann Oncol** 2008; 19 (10): 1774-86.

Amin A D, Peters T L, Li L, Rajan S S, Choudhari R, Puvvada S D, Schatz J H. Diffuse Large B-cell lymphoma: can genomics improve treatment options for a curable cancer? **Cold Spring Harb Mol Case Stud** 2017; 3 (3): a001719.

Anita Roy and Subrata Banerjee, p27 and Leukemia: Cell Cycle and Beyond, **J Cell Physiol** 2015; 230: 504–509,

Aung T, Chapuy B, Vogel D, Wenzel D, Oppermann M, Lahmann M, Weinlage T, Menck K, Hupfeld T, Koch R, Trümper L, Wulf GG. Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3. **Proc Natl Acad Sci USA** 2011; 108 (37): 15336-41.

Basso K, Dalla-Favera R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. **Nat Rev Immunol** 2015; 15 (3): 172-84.

Bastians H, Townsley F M, Ruderman J V. The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p27Kip1 Induces N-terminal Proteolytic Cleavage of Cyclin A. **PNAS** 1998; 95: 5374-81.

Baur A, Shaw P, Burri N, et al. Frequent methylation silencing of p15INK4b (MTS2) and p16INK4a (MTS1) in B-Cell and T-Cell Lymphomas. **Blood**, 94; 1773-81.

Beguelin W, Popovic R, Teater M, Jiang Y, Bunting K L, Rosen M, Shen H, Yang S N, Wang L, Ezponda T, et al. EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation. **Cancer Cell** 2013; 23 (5): 677-92.

Béguelin W, Teater M, Gearhart M D, Calvo Fernández M T, Goldstein R L, Cárdenas M G, Hatzi K, Rosen M, Shen H, Corcoran C M, Hamline M Y, Gascoyne R D, Levine R L, Abdel-Wahab O, Licht J D, Shaknovich R, Elemento O, Bardwell V J, Melnick A M. EZH2 and BCL6 Cooperate to Assemble CBX8-BCOR Complex to Repress Bivalent Promoters, Mediate Germinal Center Formation and Lymphomagenesis. **Cancer Cell** 2016; 30 (2): 197-213.

Bennit H R F, Gonda A, Oppegard L J, Chi D P, Khan S, Wall N R. Uptake of lymphoma-derived exosomes by peripheral blood leukocytes. **Blood and Lymphat Cancer: Targets and Therapy** 2017; 7: 9-23.

Beroukhi R, Mermel C H, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, Barretina J, Boehm J S, Dobson J, Urashima M, Mc Henry K T, Pinchback R M, Ligon A H, Cho Y J, Haery L, Greulich H, Reich M, Winckler W, Lawrence M S, Weir B A, Tanaka K E, Chiang D Y, Bass A J, Loo A, Hoffman C, Prensner J, Liefeld T, Gao Q, Yecies D, Signoretti S, Maher E, Kaye F J, Sasaki H, Tepper J E, Fletcher J A, Taberero J, Baselga J, Tsao M S, Demichelis F, Rubin M A, Janne P A, Daly M J, Nucera C, Levine R L, Ebert B L, Gabriel S, Rustgi A K, Antonescu C R, Ladanyi M, Letai A, Garraway L A, Loda M, Beer D G, True L D, Okamoto A, Pomeroy S L, Singer S, Golub T R, Lander E S, Getz G, Sellers W R, Meyerson M. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. **Nature** 2010; 463 (7283): 899-905.

- Besson A, Dowdy S F, Roberts JM. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* 2008; 14 (2): 159-69.
- Bhavsar T, Lee JC, Perner Y, Raffeld M, Xi L, Pittaluga S, Jaffe ES., KSHV-associated and EBV-associated Germinotropic Lymphoproliferative Disorder: New Findings and Review of the Literature. *Am J Surg Pathol* 2017; 41(6): 795-800.
- Bignell G R, Greenman C D, Davies H, Butler A P, Edkins S, Andrews J M et al. Signatures of mutation and selection in the cancer genome. *Nature* 2010; 463: 893–898.
- Bohers E, Mareschal S, Bertrand P, Viailly PJ, Dubois S, Maingonnat C, Ruminy P, Tilly H, Jardin F. Activating somatic mutations in diffuse large B-cell lymphomas: lessons from next generation sequencing and key elements in the precision medicine era. *Leuk Lymphoma* 2015; 56 (5): 1213-22.
- Bolukbasi M F, Mizrak A, Ozdener G B, Madlener S, Ströbel T, Erkan E P, Fan J B, Breakefield X O, Saydam O. miR-1289 and "Zipcode"-like Sequence Enrich mRNAs in Microvesicles. *Mol Ther Nucleic Acids* 2012; 1: e10.
- Bortoluzzi S, Lovisa F, Gaffo E, Mussolin L. Small RNAs in Circulating Exosomes of Cancer Patients: A Minireview. *High Throughput* 2017; 6(4).
- Bringold F, Serrano M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol* 2000; 35 (3): 317-29.
- Caby M P, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol* 2005; 17 (7): 879-87.
- Caganova M, Carrisi C, Varano G, Mainoldi F, Zanardi F, Germain P L, George L, Alberghini F, Ferrarini L, Talukder A K, et al. Germinal center dysregulation by histone methyltransferase EZH2 promotes lymphomagenesis. *J Clin Invest* 2013; 123, 5009–5022.
- Cai J, Han Y, Ren H, Chen C, He D, Zhou L, Eisner G M, Asico L D, Jose P A, Zeng C. Extracellular vesicle mediated transfer of donor genomic DNA to recipient cells is a novel mechanism for genetic influence between cells. *J Mol Cell Biol* 2013; 5 (4): 227-38.
- Caner V, Sen Turk N, Baris IC, Cetin GO, Tepeli E, Hacioglu S, Sari I, Zencir S, Dogu MH, Bagci G, Keskin A. MYD88 expression and L265P mutation in mature B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Genet Test Mol Biomarkers* 2015; 19 (7): 372-8.
- Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones R S, Zhang Y. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 2002; 298(5595): 1039-43.
- Cetin G O, Baris I C, Caner V, Sarikepe B, Sen Turk N, Tepeli E, Hacioglu S, Sari I, Bagci G, Keskin A. Mutational status of EZH2 and CD79B hot spots in mature B-cell non-Hodgkin's lymphomas: novel CD79B variations have been revealed. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016; 20 (5): 830-6.
- Chambwe N, Kormaksson M, Geng H, De S, Michor F, Johnson N A, Morin R D, Scott D W, Godley L A, Gascoyne R D, Melnick A, Campagne F, Shaknovich R, Variability in DNA methylation defines novel epigenetic subgroups of DLBCL associated with different clinical outcomes *Blood* 2014; 123(11): 1699-708.
- Chase A, Cross N C. Aberrations of EZH2 in cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17 (9): 2613-2618.
- Chim C S, Wong K Y, Loong F, Lam W W, Srivastava G. Frequent epigenetic inactivation of Rb1 in addition to p15 and p16 in mantle cell and follicular lymphoma. *Hum Pathol* 2007; 38: 1849–57.

Chonabayashi K, Tamori S, Taniwaki M, Fujita H, Shimazu Y, Matsui Y, Hishizawa M, Usami K, Takaori-Kondo A. Refractory IGκ/IRF4-positive DLBCL with CDKN2A/2B deletion. **Ann Hematol** 2014; 93 (5): 893-4.

Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. **Annu Rev Cell Dev Biol** 2014; 30: 255-89.

Comet I, Riising E M, Leblanc B, Helin K. Maintaining cell identity: PRC2-mediated regulation of transcription and cancer. **Nat Rev Cancer** 2016; 16 (12): 803-810.

Coppé J P, Rodier F, Patil C K, Freund A, Desprez P Y, Campisi J. Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. **J Biol Chem** 2011; 286 (42): 36396-403.

Dahlenborg K, Pound J D, Gordon J, Borrebaeck C A K & Carlsson R. Signals sustaining human immunoglobulin V gene hypermutation in isolated germinal centre B cells. **Immunology** 2000; 101 (2): 210–217.

Dalla-Favera R. Molecular genetics of aggressive B-cell lymphoma. **Hematol Oncol** 2017; (35)1:76-79.

De S, Shaknovich R, Riester M, Elemento O, Geng H, Kormaksson M, Jiang Y, Woolcock B, Johnson N, Polo J M, Cerchietti L, Gascoyne R D, Melnick A, Michor F. Aberration in DNA methylation in B-cell lymphomas has a complex origin and increases with disease severity. **PLoS Genet** 2013; 9 (1): e1003137.

De S, Shaknovich R, Riester M, et al. Aberration in DNA methylation in B-cell lymphomas has a complex origin and increases with disease severity. **PLoS Genet** 2013; 9: e1003137.

De Yébenes V G, Ramiro A R. Activation-induced deaminase: light and dark sides. **Trends Mol Med** 2006; 12 (9): 432-9.

Deschênes C, Vézina A, Beaulieu J F, Rivard N. Role of p27(Kip1) in human intestinal cell differentiation. **Gastroenterology** 2001; 120 (2): 423-38.

Drexler H G. Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukemia-lymphoma cells. **Leukemia** 1998; 12: 845–859.

Dubois S, Viailly P J, Mareschal S, Bohers E, Bertrand P, Ruminy P, Maingonnat C, Jais J P, Peyrouze P, Figeac M, et al. Next-generation sequencing in diffuse large B-cell lymphoma highlights molecular divergence and therapeutic opportunities: a LYSA study. **Clin Cancer Res** 2016; 22 (12): 2919-28.

Eguchi H, Carpentier S, Kim SS, Moss S F. P27kip1 regulates the apoptotic response of gastric epithelial cells to Helicobacter pylori. **Gut** 2004; 53 (6): 797-804.

Eijndhoven M A J, Zijlstra J M, Groenewegen N J, Drees E E, Niele S, Baglio S R, Koppers-Lalic D, Voorn H, Libregts S, Wauben M H M, Menezes R X, Weering J R T, Nieuwland R, Visser L, Berg A, Jong D, Pegtel D M. Plasma vesicle miRNAs for therapy response monitoring in Hodgkin lymphoma patients. **JCI Insight** 2016; 1 (19): e89631.

Fotinos-Ioannis D D, Anastasia K, Andrew Y, Kristen R, Stephen B, Alicia H, Malcolm B. Correlation of exosome concentrations in the plasma of lung cancer patients with disease stage **J Clinical Oncol** 2016; 34.

French K C, Antonyak M A, Cerione R A. Extracellular vesicle docking at the cellular port: Extracellular vesicle binding and uptake. **Semin Cell Dev Biol** 2017; 67: 48-55

Fujieda S, Inuzuka M, Tanaka N, Sunaga H, Fan GK, Ito T, Sugimoto C, Tsuzuki H, Saito H. Expression of p27 is associated with Bax expression and spontaneous apoptosis in oral and oropharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 1999; 84 (3): 315-20.

Galindo-Hernandez O, Villegas-Comonfort S, Candanedo F, González-Vázquez M C, Chavez-Ocaña S, Jimenez-Villanueva X, Sierra-Martinez M, Salazar E P. Elevated concentration of microvesicles isolated from peripheral blood in breast cancer patients. *Arch Med Res* 2013; 44 (3): 208-14.

Gartel A L, Serfas M S, Tyner A L. p21-Negative Regulator of the Cell Cycle. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; 213 (2): 138-49.

Goldin L R, Landgren O, McMaster M L, et al. Familial aggregation and heterogeneity of non-Hodgkin lymphoma in population-based samples. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 2402

Guney S, Jardin F, Bertrand P, Mareschal S, Parmentier F, Picquenot J M, Tilly H, Bastard C. Several mechanisms lead to the inactivation of the CDKN2A (P16), P14ARF, or CDKN2B (P15) genes in the GCB and ABC molecular DLBCL subtypes. *Genes Chromosomes Cancer* 2012; 51 (9): 858-67.

Haferlach C, Kern W, Schindela S, Kohlmann A, Alpermann T, Schnittger S, Haferlach T. Gene expression of BAALC, CDKN1B, ERG, and MN1 adds independent prognostic information to cytogenetics and molecular mutations in adult acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2012; 51(3): 257-65.

Hans C P, Weisenburger D D, Greiner T C, Gascoyne R D, Delabie J, Ott G, Müller-Hermelink H K, Campo E, Braziel R M, Jaffe E S, Pan Z, Farinha P, Smith L M, Falini B, Banham A H, Rosenwald A, Staudt L M, Connors J M, Armitage J O, Chan W C. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004; 103 (1): 275-82.

Harikumar A, Meshorer E. Chromatin remodeling and bivalent histone modifications in embryonic stem cells. *EMBO Rep* 2015;16 (12): 1609-19.

Hayslip J, Montero A. Tumor suppressor gene methylation in follicular lymphoma: a comprehensive review. *Mol Cancer* 2006; 5: 44.

Hazan-Halevy I, Rosenblum D, Weinstein S, Bairey O, Raanani P, Peer D. Cell-specific uptake of mantle cell lymphoma-derived exosomes by malignant and non-malignant B-lymphocytes. *Cancer Lett* 2015; 364 (1): 59–69.

He M, Crow J, Roth M, Zeng Y, Godwin A K. Integrated immunoisolation and protein analysis of circulating exosomes using microfluidic technology. *Lab Chip* 2014; 14 (19): 3773-80.

Henne W M, Buchkovich N J, Emr S D. The ESCRT pathway. *Dev Cell* 2011; 21 (1): 77-91.

Herman J G, Civin C I, Issa J P J, Collector M I, Sharkis S J, Baylin S B. Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res* 1997; 57: 837–841.

Heyn H, Esteller M. EZH2: an epigenetic gatekeeper promoting lymphomagenesis. *Cancer Cell* 2013; 23 (5): 563-5.

Hiomura K, Pippin J W, Fero M L, Roberts J M, Shankland S J. Modulation of apoptosis by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1). *J Clin Invest* 1999; 103 (5): 597-604.

Ho S S, Zhang W Y, Tan N Y, Khatoo M, Suter M A, Tripathi S, Cheung F S, Lim W K, Tan P H, Ngeow J, et al. The DNA structure-specific endonuclease MUS81 mediates

DNA sensor STING-dependent host rejection of prostate cancer cells. *Immunity* 2016; 44: 1177–1189.

Hong B S, Cho J H, Kim H, Choi E J, Rho S, Kim J, Kim J H, Choi D S, Kim Y K, Hwang D, Gho Y S. Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells. *BMC Genomics* 2009; 10: 556.

http://exocarta.org/gene_summary?gene_id=11461

<http://www.cancerindex.org/geneweb/CDKN2A.htm>

<https://www.bsse.ethz.ch/Isi/research/systems-immunology.html>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1030>

Jiang Y, Dominguez P M, Melnick A M. The many layers of epigenetic dysfunction in B-cell lymphomas. *Curr Opin Hematol* 2016; 23 (4): 377-84.

Jiang Y, Melnick A. The epigenetic basis of diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Hematol* 2015; 52 (2): 86-96.

Jin Y, Chen K, Wang Z, Wang Y, Liu J, Lin L, Shao Y, Gao L, Yin H, Cui C, Tan Z, Liu L, Zhao C, Zhang G, Jia R, Du L, Chen Y, Liu R, Xu J, Hu X, Wang Y. DNA in serum extracellular vesicles is stable under different storage conditions. *BMC Cancer* 2016; 16: 753.

José P. Vaqué, Nerea Martínez, Ana Batlle-López, Cristina Pérez, Santiago Montes-Moreno, Margarita Sánchez-Beato, and Miguel A. Piris. B-cell lymphoma mutations: improving diagnostics and enabling targeted therapies. *Haematologica* 2014; 99 (2): 222–231.

Kahlert C, Melo S A, Protopopov A, Tang J, Seth S, Koch M, Zhang J, Weitz J, Chin L, Futreal A, Kalluri R. Identification of Double stranded Genomic DNA Spanning All Chromosomes with Mutated *KRAS* and *p53* DNA in the Serum Exosomes of Patients with Pancreatic. *Cancer J Biol Chem* 2014; 289(7): 3869–3875.

Kalishwaralal K, Kwon W Y, Park K S. Exosomes for non-invasive cancer monitoring. *Biotechnol J* 2018; 25: e1800430.

Kalluri R, LeBleu V S. Discovery of Double-Stranded Genomic DNA in Circulating Exosomes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2016; 81: 275-280.

Katayose Y, Kim M, Rakkar A N, Li Z, Cowan K H, Seth P. Promoting apoptosis: a novel activity associated with the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Cancer Res* 1997; 57 (24): 5441-5.

Kawamura K, Wada A, Wang J Y, Li Q, Ishii A, Tsujimura H, Takagi T, Itami M, Tada Y, Tatsumi K, Shimada H, Hiroshima K, Tagawa M. Expression of activation-induced cytidine deaminase is associated with a poor prognosis of diffuse large B cell lymphoma patients treated with CHOP-based chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 2016; 142(1): 27-36.

Klangby U, Okan I, Magnusson K P, Wendland M, Lind P, Wiman K G. p16/INK4a and p15/INK4b gene methylation and absence of p16/INK4a mRNA and protein expression in Burkitt's lymphoma. *Blood* 1998; 91: 1680–7.

Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 2008; 8 (1): 22-33.

Koch R, Demant M, Aung T, Diering N, Cicholas A, Chapuy B, Wenzel D, Lahmann M, Güntsch A, Kiecke C, Becker S, Hupfeld T, Venkataramani V, Ziepert M, Opitz L, Klapper W, Trümper L, Wulf G G. Populational equilibrium through exosome-mediated Wnt signaling in tumor progression of diffuse large B-cell lymphoma. **Blood** 2014; 123 (14): 2189-98.

Koff A, Ohtsuki M, Polyak K, Roberts JM, Massagué J. Negative regulation of G1 in mammalian cells: inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF-beta. **Science** 1993; 260(5107): 536-9.

Kowal J, Tkach M, Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes. **Curr Opin Cell Biol** 2014; 29: 116-25.

Krajnović M, Jovanović M P, Mihaljević B, Anđelić B, Tarabar O, Knežević-Ušaj S, Krtolica K. Hypermethylation of p15 gene in diffuse - large B-cell lymphoma: association with less aggressiveness of the disease. **Clin Transl Sci** 2014; 7(5): 384-90.

Kuppers R, Klein U, Hansmann M L & Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. **N Engl J Med** 1999; (20): 1520-1529.

Lacroix R, Judicone C, Mooberry M, Boucekine M, Key N S, Dignat-George F, "The ISTH SSC Workshop. Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle determination: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop", **J Throm and Haem** 2013.

Laharanne E, Chevret E, Idrissi Y, Gentil C, Longy M, Ferrer J, Dubus P, Jouary T, Vergier B, Beylot-Barry M, Merlio J P. CDKN2A-CDKN2B deletion defines an aggressive subset of cutaneous T-cell lymphoma. **Mod Pathol** 2010; 23 (4): 547-58.

Latifkar A, Cerione R A, Antonyak M A. Probing the mechanisms of extracellular vesicle biogenesis and function in cancer. **Biochem Soc Trans** 2018; 46 (5): 1137-1146.

Le M, Fernandez-Palomo C, McNeill F E, Seymour C B, Rainbow A J, Mothersill C E. Exosomes are released by bystander cells exposed to radiation-induced biophoton signals: Reconciling the mechanisms mediating the bystander effect. **PLoS One**. 2017; 12 (3): e0173685.

Lee H D, Kim Y H, Kim D S. Exosomes derived from human macrophages suppress endothelial cell migration by controlling integrin trafficking. **Eur J Immunol** 2014; 44 (4): 1156-69.

Lee H J , Shin D H , Kim K B , et al . Polycomb protein EZH2 expression in diffuse large B-cell lymphoma is associated with better prognosis in patients treated with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone. **Leuk Lymphoma** 2014; 55 (9): 2056-63.

Lee J K, Park S R, Jung B K, Jeon Y K, Lee Y S, Kim M K, Kim Y G, Jang J Y, Kim C W. Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress angiogenesis by down-regulating VEGF expression in breast cancer cells. **PLoS One** 2013; 8(12): e84256.

Lefranc M. & Lefranc G. The immunoglobulin Facts Book, **Elsevier**, 2001.

Lenz G, Wright G W, Emre N C, et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. **Proc Natl Acad Sci** 2008; 105 (36): 13520-5.

Levkau B, Koyama H, Raines E W, Clurman B E, Herren B, Orth K, Roberts J M, Ross R. Cleavage of p21Cip1/Waf1 and p27Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade. **Mol Cell** 1998;1(4): 553-63.

- Li Y, Wang Y, Wang Z, Yi D, Ma S. Racial differences in three major NHL subtypes: Descriptive epidemiology. **Cancer Epidemiol** 2015; 39: 8–13
- Lohr J G, Stojanov P, Lawrence M S, Auclair D, Chapuy B, Sougnez C, Cruz-Gordillo P, Knoechel B, Asmann YW, Slager SL, et al. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. **Proc Natl Acad Sci** 2012; 109 (10): 3879-84.
- Lossos I S, Levy R, Alizadeh A A. AID is expressed in germinal center B-cell-like and activated B-cell-like diffuse large-cell lymphomas and is not correlated with intracлонаl heterogeneity. **Leukemia** 2004; 18 (11): 1775-9.
- Lötvall J, Hill A F, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, Gho Y S, Kurochkin IV, Mathivanan S, Quesenberry P, Sahoo S, Tahara H, Wauben M H, Witwer K W, Théry C. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. **J Extracell Vesicles**. 2014; 3: 26913.
- Male D, Brostoff J, Roth DB. "Cells, tissues and organs of the immune system" Roitt I. Immunology, **Wiley Blackwell**, 2006, 7th Ed., 19-59.
- Male D, Brostoff J, Roth DB. "Innate immunity" Roitt I. Immunology, **Wiley Blackwell**, 2017, 12th Ed., 3-35.
- McCready J, Sims J D, Chan D, Jay D G. Secretion of extracellular hsp90 α via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. **BMC Cancer** 2010; 10: 294.
- McDonald M K, Capasso K E, Ajit S K, Purification and microRNA profiling of exosomes derived from blood and culture media. **J Vis Exp** 2013; (76): e50294.
- Meister A, Hentrich M, Wyen C, Hübel K. Malignant lymphoma in the HIV-positive patient. **Eur J Haematol** 2018; 101 (1): 119-126.
- Morin R D, Mungall K, Pleasance E, Mungall A J, Goya R, Huff R D, Scott D W, Ding J, Roth A, Chiu R, et al. Mutational and structural analysis of diffuse large B-cell lymphoma using whole-genome sequencing. **Blood** 2013. 122: 1256–1265.
- Nakanishi M, Kaneko Y, Matsushime H and et al. Direct Interaction of p21 Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor with the Retinoblastoma Tumor Suppressor Protein. **Biochem Biophys Res Commun** 1999; 263 (1): 35-40.
- Ngo V N, Young R M, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim K H, Kohlhammer H, Xu W, Yang Y, Zhao H, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. **Nature** 2011; 470 (7332): 115-9.
- Otsuki T, Clark H M, Wellmann A, Jaffe E S, Raffeld M. Involvement of CDKN2 (p16INK4A/MTS1) and p15INK4B/MTS2 in human leukemias and lymphomas. **Cancer Res** 1995, 55: 1436–1440
- Pallares N, Lefebvre S, Contet V, Matsuda F & Lefranc M P. The human immunoglobulin heavy variable genes. **Exp Clin Immunogenet** 1999; 16 (1): 36-60.
- Pan H, Jiang Y, Boi M, Tabbò F, Redmond D, Nie K, Ladetto M, Chiappella A, Cerchiatti L, Shaknovich R, Melnick A M, Inghirami G G, Tam W, Elemento O. Epigenomic evolution in diffuse large B-cell lymphomas. **Nat Commun** 2015; 20 (6): 6921.
- Park K H, Seol J Y, Kim T Y, Yoo C G, Kim Y W, Han S K, Shim Y S, Lee C T. An adenovirus expressing mutant p27 showed more potent antitumor effects than adenovirus-p27 wild type. **Cancer Res** 2001; 61 (16): 6163-9.

Pasqualucci L, Dalla-Favera R. Genetics of diffuse large B-cell lymphoma. **Blood** 2018; 131 (21): 2307-2319.

Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, Ma J, Rossi D, Chiarenza A, Wells VA, Grunn A, Messina M, Elliot O, et al. 2011. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. **Nat Genet** 2011; 43 (9): 830-7.

Perez-Hernandez D, Gutierrez-Vazquez C, Jorge I, Lopez-Martin S, Ursa A, Sanchez-Madrid F, et al. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. **J Biol Chem** 2013; 288 (17): 11649–61.

Polyak K, Kato J Y, Solomon M J, Sherr C J, Massague J, Roberts J M, Koff A. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. **Genes Dev** 1994; 8 (1): 9-22.

Polyak K, Lee M H, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts J M, Tempst P, Massagué J. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. **Cell** 1994; 78(1): 59-66.

Psofaki V, Kalogera C, Tzambouras N, Stephanou D, Tsianos E, Seferiadis K, Kolios G. Promoter methylation status of hMLH1, MGMT, and CDKN2A/p16 in colorectal adenomas. **World J Gastroenterol** 2010; 16 (28): 3553-60.

Qian Z, Shen Q, Yang X, Qiu Y, Zhang W. The Role of Extracellular Vesicles: An Epigenetic View of the Cancer Microenvironment. **Biomed Res Int** 2015; 2015: 649161.

Reddy A, Zhang J, Davis N S, Moffitt A B, Love CL, Waldrop A, Leppa S, Pasanen A, Meriranta L, Karjalainen-Lindsberg ML, Nørgaard P, Pedersen M, Gang A O, Høgdall E, Heavican T B, Lone W⁵, Iqbal J, Qin Q, Li G, Kim S Y, Healy J, Richards K L, Fedoriv Y, Bernal-Mizrachi L, Koff J L, Staton A D, Flowers C R, Paltiel O, Goldschmidt N, Calaminici M, Clear A, Gribben J, Nguyen E, Czader M B, Ondrejka S L, Collie A, Hsi E D, Tse E, Au-Yeung R K H, Kwong Y L, Srivastava G, Choi W W L, Evens A M, Pilichowska M, Sengar M, Reddy N, Li S, Chadburn A, Gordon L I, Jaffe E S, Levy S, Rempel R, Tzeng T, Happ L E, Dave T, Rajagopalan D, Datta J, Dunson D B, Dave S S. Genetic and functional drivers of diffuse large B cell lymphoma. **Cell** 2017; 171 (2): 481-494

Robertson K D, Jones P A. Tissue-specific alternative splicing in the human INK4a/ARF cell cycle regulatory locus. **Oncogene** 1999;18 (26): 3810-20.

Rovira J, Karube K, Valera A, Colomer D, Enjuanes A, Colomo L, Martínez-Trillos A, Giné E, Dlouhy I, Magnano L, Delgado J, Martínez A, Villamor N, Campo E, López-Guillermo A. MYD88 L265P Mutations, But No Other Variants, Identify a Subpopulation of DLBCL Patients of Activated B-cell Origin, Extranodal Involvement, and Poor Outcome. **Clin Cancer Res** 2016; 22 (11): 2755-64.

Roy A and Banerjee S, p27 and Leukemia: Cell Cycle and Beyond. **J Cell Physiol** 2015; 230 (3): 504-9.

Rutherford S C, Sawh S, Saxena A, Ishii J, Dominguez M D, Chambwe N, Lopes E C, Agirre X, Doron Betel and Rita Shaknovich. Characterization of DLBCL-Derived Exosomes and Investigation of Their Biological Properties **Blood** 2014; 124: 3021

Rutherford S C, Fachel A A, Li S, Sawh S, Muley A, Ishii J, Saxena A, Dominguez P M, Caldas Lopes E, Agirre X, Chambwe N, Correa F, Jiang Y, Richards K L, Betel D, Shaknovich R. Extracellular vesicles in DLBCL provide abundant clues to aberrant transcriptional programming and genomic alterations. **Blood** 2018; 132 (7): 13-23.

Sánchez-Beato M, Sánchez-Aguilera A, Piris M A. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. **Blood** 2003; 101 (4): 1220-35.

Sato Y, Suto Y, Pietenpol J, Golub TR, Gilliland DG, Davis EM, Le Beau MM, Roberts JM, Vogelstein B, Rowley JD, et al. TEL and KIP1 define the smallest region of deletions on 12p13 in hematopoietic malignancies. **Blood** 1995; 86 (4): 1525-33.

Schmitz R, Wright G W, Huang D W, Johnson C A, Phelan J D, Wang J Q, Roulland S, Kasbekar M, Young R M, Shaffer A L, Hodson D J, Xiao W, Yu X, Yang Y, Zhao H, Xu W, Liu X, Zhou B, Du W, Chan W C, Jaffe E S, Gascoyne R D, Connors J M, Campo E, Lopez-Guillermo A, Rosenwald A, Ott G, Delabie J, Rimsza L M, Tay Kuang Wei K, Zelenetz AD, Leonard J P, Bartlett N L, Tran B, Shetty J, Zhao Y, Soppet D R, Pittaluga S, Wilson W H, Staudt L M. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. **N Engl J Med** 2018; 378 (15): 1396-1407.

Shaknovich R, Cerchietti L, Tsikitas L, Kormaksson M, De S, Figueroa ME, et al. DNA methyltransferase 1 and DNA methylation patterning contribute to germinal center B-cell differentiation. **Blood** 2011; 118: 3559–69.

Shen Y J, Le Bert N, Chitre A A, Koo C X, Nga X H, Ho S S, Khato M, Tan N Y, Ishii K J, Gasser S. Genome-derived cytosolic DNA mediates type I interferon-dependent rejection of B cell lymphoma cells. **Cell Rep** 2015; 11: 460–473,

Shiozawa E, Takimoto M, Makino R, Adachi D, Saito B, Yamochi-Onizuka T, Yamochi T, Shimosuma J, Maeda T, Kohno Y, Kawakami K, Nakamaki T, Tomoyasu S, Shiokawa A, Ota H. Hypermethylation of CpG islands in p16 as a prognostic factor for diffuse large B-cell lymphoma in a high-risk group. **Leuk Res** 2006; 30 (7): 859-67.

Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer D H, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry W T Jr, Carter B S, Krichevsky A M, Breakefield X O. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. **Nat Cell Biol** 2008; 10 (12): 1470-6.

Sneeringer C J, Scott M P, Kuntz K W, et al. Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2010; 107 (49): 20980-20985.

Speicher M R, Pantel K. Tumor signatures in the blood. **Nat Biotechnol** 2014; 32 (5): 441-3.

Stavnezer J, Schrader C E. IgH Chain Class Switch Recombination: Mechanism and Regulation. **J Immunol** 2014; 193 (11): 5370-5378.

Su I H, Basavaraj A, Krutchinsky A N, Hobert O, Ullrich A, Chait B T, Tarakhovskiy A. Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. **Nature immun** 2003; 4: 124–131,

Swerdlow S H, Campo E, Pileri S A, Harris N L, Stein H. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms, **Blood** 2016; 127(20): 2375-2390.

Szajnik M, Derbis M, Lach M, Patalas P, Michalak M, Drzewiecka H, Szpurek D, Nowakowski A, Spaczynski M, Baranowski W, Whiteside T L. Exosomes in Plasma of Patients with Ovarian Carcinoma: Potential Biomarkers of Tumor Progression and Response to Therapy. **Gynecol Obstet (Sunnyvale)** 2013; 4:3. Szczepanski M J, Szajnik M, Welsh A, Whiteside T L, Boyiadzis M. Blast-derived microvesicles in sera from patients with acute myeloid leukemia suppress natural killer cell function via membrane-associated transforming growth factor- β 1 **Haematologica** 2011; 96 (9): 1302–1309.

- Taylor D D, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. **Gynecol Oncol** 2008; 110 (1): 13-21.
- Taylor D D, Gerçel-Taylor C. Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects. **Br J Cancer** 2005; 92 (2): 305-11.
- Thakur B K, Zhang H, Becker A, Matei I, Huang Y, Costa-Silva B, Zheng Y, Hoshino A, Brazier H, Xiang J, Williams C, Rodriguez-Barrueco R, Silva J M, Zhang W, Hearn S, Elemento O, Paknejad N, Manova-Todorova K, Welte K, Bromberg J, Peinado H, Lyden D. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. **Cell Res** 2014; 24 (6): 766-9.
- Thomas J Kindt, Barbara A, Osborne, Richard A. Goldsby."B-Cell Generation, Activation, and Differentiation" Kuby Immunology, **Macmillan Education**, 2006, 6th Edition, 271-278.
- Tkach M, Théry C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. **Cell** 2016; 164 (6): 1226-1232.
- Toyoshima H¹, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. **Cell** 1994; 78(1): 67-74.
- Velichutina I, Shaknovich R, Geng H, Johnson N A, Gascoyne R D, Melnick A M, Elemento O. EZH2-mediated epigenetic silencing in germinal center B cells contributes to proliferation and lymphomagenesis. **Blood** 2010; 116: 5247–5255.
- Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Madrid F, Mittelbrunn M. Sorting it out: regulation of exosome loading. **Semin Cancer Biol** 2014; 28: 3-13.
- Wan J C M, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton J D, Caldas C, Pacey S, Baird R, Rosenfeld N
Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. **Nat Rev Cancer** 2017; 17 (4): 223-238.
- Wang L, Li Y, Guan X, Zhao J, Shen L, Liu J. Exosomal double-stranded DNA as a biomarker for the diagnosis and preoperative assessment of pheochromocytoma and paraganglioma. **Mol Cancer** 2018; 17(1): 128.
- Watanabe M, Nakahata S, Hamasaki M, Saito Y, Kawano Y, Hidaka T, Yamashita K, Umeki K, Taki T, Taniwaki M, Okayama A, Morishita K. Downregulation of CDKN1A in adult T-cell leukemia/lymphoma despite overexpression of CDKN1A in human T-lymphotropic virus 1-infected cell lines. **J Virol** 2010; 84(14): 6966-77.
- Whiteside T L Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Cancer Progression. **Adv Clin Chem**. 2016; 74: 103-41.
- Witwer K W, Buzás E I, Bemis L T, Bora A, Lässer C, Lötvald J, Nolte-t Hoen E N, Piper M G, Sivaraman S, Skog J, Théry C, Wauben M H, Hochberg F. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. **J Extracell Vesicles** 2013; 2.
- Wolff L, Bies J. p15Ink4b Functions in determining hematopoietic cell fates: implications for its role as a tumor suppressor. **Blood Cells Mol Dis** 2013; 50 (4): 227-31.
- Wong I H, Lo Y M, Yeo W, Lau W Y, Johnson P J. Frequent p15 promoter methylation in tumor and peripheral blood from hepatocellular carcinoma patients **Clin Cancer Res** 2000; 6(9): 3516-21.
- Wu Y, Deng W, Klinke D J, Exosomes: improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers. **Analyst** 2015; 140(19): 6631-42.

Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. **Nature** 1993; 366 (6456): 701-4.

Xiong Y, Zhang H, Beach D. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. **Cell** 1992; 71 (3): 505-14.

Yamaguchi H, Hung M C. Regulation and Role of EZH2 in Cancer. **Cancer Res Treat** 2014; 46 (3): 209-22.

Yang S, Che S P, Kurywchak P, Tavormina J L, Gansmo L B, Correa de Sampaio P, Tachezy M, Bockhorn M, Gebauer F, Haltom A R, et al. Detection of mutant KRAS and TP53 DNA in circulating exosomes from healthy individuals and patients with pancreatic cancer. **Cancer Biol Ther** 2017. 18: 158–165.

Yeh Y-Y, Ozer H G, Lehman A M, Maddocks K, Yu L, Johnson A J, Byrd J C. Characterization of CLL exosomes reveals a distinct microRNA signature and enhance dsecretion by activation of BCR signaling. **Blood** 2015; 125 (21): 3297–3305.

Yi X, Ma J, Guan Y, Chen R, Yang L, Xia X. The feasibility of using mutation detection in ctDNA to assess tumor dynamics. **Int J Cancer** 2017; 140(12): 2642-2647.

Zainuddin N, Kanduri M, Berglund M, Lindell M, Amini RM, Roos G, Sundström C, Enblad G, Rosenquist R. Quantitative evaluation of p16(INK4a) promoter methylation using pyrosequencing in de novo diffuse large B-cell lymphoma. **Leuk Res** 2011; 35 (4): 438-43.

Zhou Z, Gao J, Popovic R, Wolniak K, Parimi V, Winter J N, Licht J D, Chen Y H. Strong expression of EZH2 and accumulation of trimethylated H3K27 in diffuse large B-cell lymphoma independent of cell of origin and EZH2 codon 641 mutation. **Leuk Lymphoma** 2015; 56 (10): 2895-901.

8.ÖZGEÇMİŞ

İkbal Cansu BARIŞ 1987 yılında Dinar'da doğdu. İlkokulu, ortaokulu ve liseyi Denizli'de okuduktan sonra, üniversiteyi de 2005-2010 yılları arasında Ege Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyokimya Bölümü'nde okudu. 2011-2013 yılları arasında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2013 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı.

9.EKLER

Yayın Beyan Sayfası

Kilic-Toprak E, Kilic-Erkek O, Abban-Mete G, Caner V, **Baris IC**, Turhan G, Kucukatay V, Senol H, Kuru O, Bor-Kucukatay M. Contribution of Heme Oxygenase 2 to Blood Pressure Regulation in Response to Swimming Exercise and Detraining in Spontaneously Hypertensive Rats. *Med Sci Monit.* 2018 Aug 22;24:5851-5859.

Caliskan G, **Baris IC**, Ayaydin F, Dobson MJ, Senarisoy M, Boros IM, Topcu Z, Zencir S.

Che1/AATF interacts with subunits of the histone acetyltransferase core module of SAGA complexes. *PLoS One.* 2017 Dec 12;12(12):e0189193.

Sabah-Ozcan S, Baser A, Olcucu T, Baris IC, Elmas L, Tuncay L, Eskicorapci S, Turk NS, Caner V. Human TLR gene family members are differentially expressed in patients with urothelial carcinoma of the bladder. *Urol Oncol.* 2017 Dec;35(12):674.e11-674.e17.

Cetin GO, **Baris IC**, Caner V, Sarikepe B, Sen Turk N, Tepeli E, Hacıoglu S, Sari I, Bagci G, Keskin A. Mutational status of EZH2 and CD79B hot spots in mature B-cell non-Hodgkin's lymphomas: novel CD79B variations have been revealed. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016 Mar;20(5):830-6.

Caner V, Sen Turk N, **Baris IC**, Cetin GO, Tepeli E, Hacıoglu S, Sari I, Zencir S, Dogu MH, Bagci G, Keskin A. MYD88 expression and L265P mutation in mature B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2015 Jul;19(7):372-8.



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik
Kurulu



Sayı :60116787-020/16710
Konu :Başvurunuz hk.

10/03/2016

Sayın Prof. Dr. Gülseren BAĞCI

İlgi :02.03.2016 tarihli dilekçeniz.

İlgi dilekçe ile başvurmuş olduğunuz "Diffüz Büyük B-hücreli Lenfomada eksozomal ve nükleer DNA metilasyon paternlerinin karşılaştırılması" konulu çalışmanız 08.03.2016 tarih ve 05 sayılı kurul toplantımızda görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu çalışmanın yapılmasında **ETİK AÇIDAN SAKINCA OLMADIĞINA**, altı ayda bir çalışma hakkında Kurulumuza bilgi verilmesine oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Tahir TURAN
Başkan