

T.C
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

MULTİPLE MYELOMA HASTA
LENFOSİTLERİNDE ÖLÜMCÜL LİGAND
SENTEZİNİN ÖNEMİ

Fatma Zehra HAPİL

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2012

T.C
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

MULTİPLE MYELOMA HASTA
LENFOSİTLERİNDE ÖLÜMCÜL LİGAND
SENTEZİNİN ÖNEMİ

Fatma Zehra HAPİL

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Taraından desteklenmiştir. (Proje No: 2010.02.0122.016)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2012

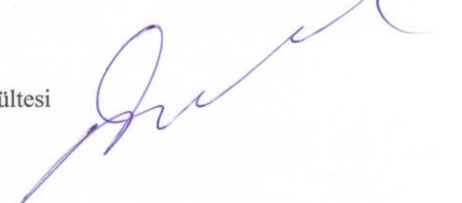
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Yüksek Lisans Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. .../.../2012

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Salih ŞANLIOĞLU
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Levent ÜNDAR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Hematoloji Bilim Dalı



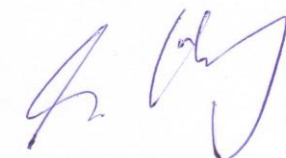
Üye : Prof. Dr. Osman Nidai ÖZEŞ
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Sadi KÖKSOY
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı



ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun .../.../2012 tarih ve .../.... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

En sık rastlanılan ikinci hematolojik kanser olan Multiple Myeloma (MM), kanser kaynaklı ölümlerin %2'sinden sorumludur. Pek çok kanser olgusunda olduğu gibi MM hastalarında da progresif (ilerleyici) immün yetmezlik söz konusudur. Sağlıklı bir bağışıklık sistemi, tümör hücrelerine karşı bir gözetim mekanizması geliştirerek kanserleşmeyi engelleyebilir. Bağışıklık sisteminin bu amaç için kullandığı yollardan birisi, ölümcül ligand aracılı apoptoz uyarımıdır. Ölümcül ligand aracılı apoptoz uyarımının gerçekleşmesi için ölümcül ligandların hedef hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine bağlanması ve ölüm reseptörlerinin de hücre içi apoptotik sinyalleşmeyi uyarması gerekir. Myeloma hücrelerinin yüzeyinde ölüm reseptörleri sentezlendiği ve bu hücrelerin in vitro ortamda ölümcül ligandlar aracılığıyla apoptoza yönlendirilebildiği bilinmektedir. Buna rağmen MM hastalarında myeloma hücrelerinin sağ kalıp çoğalabilmesi, ortamda ölümcül ligand eksikliğinin söz konusu olabileceğini düşündürmektedir. MM hastalarına ait sitotoksik lenfositlerde sağlıklı kontrol lenfositlerine nazaran azalmış FasL ve TRAIL ekspresyonu gözleneceğine dair hipotezimizi test etmek için periferik kan örneklerini akış sitometri yöntemiyle analiz ettik. Sonuçlarımız, MM hastalarının CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+ ve CD3- lenfositlerinde FasL ve TRAIL protein düzeylerinde azalmayı işaret etmekte iken, CD4+CD25+ hücrelerde ise protein düzeyinde belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. Şaşırtıcı biçimde, iki grup arasında pozitif / negatif hücre oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Sonuçlarımız, ölümcül ligand eksprese eden lenfosit sayılarında fark olmamasına karşın bu hücrelerin yüzey ligand sentez seviyelerinde azalma olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Ölümcül Ligandlar, FasL, TRAIL, Multiple Myeloma, T lenfositleri

ABSTRACT

Multiple Myeloma (MM), the second most common hematologic malignancy, is responsible for 2% of all cancer-related deaths. Like most of the cancer cases, MM patients also suffer from progressive immunodeficiency. Normally, “immune-surveillance” mechanism, if not disturbed, is the default strategy of body to prevent expansion of tumor cells. One of the strategies immune system cells use in this process is the death-ligand mediated apoptosis induction. Myeloma cells have death receptors on their surface; yet, for induction of apoptosis through these receptors, death ligands should be present in the vicinity of the receptors. The main sources for death ligands are the cytotoxic lymphocytes of the immune system. Thus, we hypothesized that, one of the reasons why myeloma cells survive may be the absence of the death ligands, as those cells escape from apoptosis despite the death receptor expression on their surface. In order to test our hypothesis, we studied peripheral blood samples of MM patients to investigate surface FasL and TRAIL expression. Then we compared FasL and TRAIL surface expression patterns on MM patient peripheral blood lymphocytes with those of the healthy age/sex matched volunteers. Our results indicated reduced numbers of FasL and TRAIL proteins on CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+ and CD3- lymphocytes of MM patients, although CD4+CD25+ cells did not exhibit a similar phenotype. Intriguingly, the positive/negative cell ratio was not statistically different between two groups. Thus, our results show that, although death ligand expressing lymphocyte numbers do not change between two groups, surface ligand expression on these positive cells gets downregulated. This, indeed, may represent a possible pathway used by myeloma cells to escape from the anti-tumor immunity.

Key Words: Death Ligands, FasL, TRAIL, Multiple Myeloma, T lymphocytes, Anti-tumor immunity

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim öncesindeki staj dönemimden bu yana danışmanlığımı yapmakta olan ve tecrübelerini paylaşarak beni geleceğe hazırlayan Prof.Dr. Salih Şanlıoğlu'na; bana öğrettiği ve öğretmekte olduğu her şey için Gen ve Hücre Tedavi Merkezi müdürü sayın hocam Doç.Dr. Ahter Dilşad Şanlıoğlu'na,; yüksek lisans derslerinde bana öğrettikleri bilgiler ve üzerimde bulunan emekleri için Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarıma teşekkür ederim

Tez projemizin yazımı sırasında danışmanlığını bizden esirgemeyen sayın Prof. Dr. Levent Ündar'a; akış sitometri tekniğini öğretmek başta olmak üzere tez projem sürecinde desteğini her zaman hissettirmiş olan Doç.Dr. Sadi Köksoy'a; tez savunma jürimde de bulunan anabilim dalı başkanımız Prof.Dr. Nidai Özeş'e; yedek jüri üyelerimiz Prof.Dr. Özgül Alper ve Yrd.Doç.Dr. Ayşe Esra Manguoğlu'na teşekkürü borç bilirim.

Tez projem sürecinde hasta örneklerini elde edebilmem için emek sarf etmiş olan Hematoloji uzmanı Dr. Fadime Ersoy Dursun'a ve Antalya Eğitim Araştırma Hastane'sinden sayın Doç.Dr. Erdal Kurtuluşlu'na; ek olarak, tez projemizin yazımı sırasında yardımcı olmuş olan Dr. Atıl Bişgin'e ve Yrd. Doç.Dr. Ozan Salim'e teşekkürlerimi sunarım.

Tıbbi Genetik Programı'nda yüksek lisans eğitimim sürecinde bana destek olmuş olan Arş. Gör. Burcu Şahan, Arş. Gör. İrem Kanatlı başta olmak üzere bütün asistan arkadaşlarıma ve yine deneylerim esnasında yardımcı olmuş olan asistan arkadaşım Arş. Gör. Nil Güzel'e; bana daima destek olmuş olan Nagihan Girişen ve Özlem Akdeniz Duymuş'a teşekkür ederim. Sayın Av. Muammer Hapil'e de, tez çalışmamızdaki kontrol grubu bireylerini usanmadan arayıp bulduğu için minnettarım.

Bütün süreçler boyunca sıkılmadan yardımcı olmuş olan Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına, Anabilim Dalı Sekreterimiz Neriman Galın'a, bölümümüz teknik ekibine ve akış sitometri ünitesinde yardımlarını gördüğüm Derya Dertsiz'e teşekkür ederim.

En önemlisi; babam Muammer Hapil'e, annem Melek Hatice Hapil'e, ablam Nisanur Ş. Hapil, kardeşlerim Rabia Seher ve Mehmet Kağan'a hayatım boyunca gösterdikleri bütün maddi ve manevi destekler için minnettar olduğumu belirtmek isterim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2
2.1. Multiple Myeloma	2
2.1.1 Tarihsel Süreçte Multiple Myeloma:	2
2.1.2. Myeloma Tanımı, Biyolojisi ve Mikroçevre	3
2.1.3. Multiple Myeloma Etiyolojisi	7
2.2. Multiple Myeloma ve Bağışıklık Sistemi	9
2.2.1. T Lenfositleri ve MM	11
2.2.1.1 Multiple Myeloma’da Gözlenen T Hücre Bozuklukları:	11
2.3. Ölümcül Ligandlar: FasL ve TRAIL	12
GEREÇ ve YÖNTEM	16
3.1. Hasta Örneklerinin Elde Edilmesi:	16
3.2. Kontrol Grubu Örneklerinin Elde Edilmesi:	16
3.3. Akış Sitometrisi	16
3.3.1. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması:	16
3.3.2. Akış Sitometri Analizi için Boyama Protokolü:	17
3.3.3. Akış Sitometri Analiz Protokolü:	17
3.3.4. Sinyal Değerlerinin Analizi ve İstatistiksel Değerlendirme:	18
3.3.4. İstatistiksel Analiz ve Verilerin Hazırlanması	18
BULGULAR	20
4.1. FasL ve TRAIL proteinlerinin lenfositler yüzeyindeki ekspresyonu akış sitometrisi ile gösterilebilmektedir.	20
4.2. Multiple Myeloma Hastalarına Ait Periferik Kan Lenfositlerindeki TRAIL ve FasL Ekspresyonu Sağlıklı Kontrollere Nazaran Düşük Gözlenmiştir.	20
4.2.1. MM hastaları ve Sağlıklı Kontrollere Ait Lenfositlerdeki FasL Ekspresyon Profillerinin Değerlendirilmesi.	21

4.2.2.	MM hastaları ve Sağlıklı Kontrollere Ait Lenfositlerdeki TRAIL Ekspresyon Profillerinin Değerlendirilmesi.	23
4.3.	MM Hastaları ve Sağlıklı Kontrollerin Lenfositlerindeki Hücre Başına Düşen Ölümcül Ligand Sayısı Kantitatif Olarak Değerlendirildiğinde Farklılık Belirlenmiştir.	25
4.3.1.	MM hastaları ve Sağlıklı Kontrollere Ait Lenfositlerin Yüzeyinde Sentezlenen FasL ve TRAIL Protein Sayılarının Değerlendirilmesi	26
4.4.	MM Hastaları ve Sağlıklı Kontrollerin Ölümcül Ligand Sentezleyen Lenfosit Oranları Arasında Anlamlı Bir Farklılık Gözlenmedi.	28
4.5.	Lenfositler Yüzeyindeki FasL ve TRAIL Ekspresyon Profilleri Birbiri ile Bağlantılı Bulundu.	30
TARTIŞMA ve SONUÇLAR		32
KAYNAKLAR		35
ÖZGEÇMİŞ		43
EKLER		1
EK1: HEMATOPOEZDE PLAZMA HÜCRE GELİŞİMİ		

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

MM	:	Multiple Myeloma
TNF-α	:	Tumor Necrosis Factor Alpha (Tümör Nekroz Faktörü- alfa)
TRAIL	:	TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand (TNF-ilişki Apoptoz İndükleyici Ligand)
Fas-L	:	Fas (Fibroblast Associated) Ligand (Fas (Fibroblast İlişkili) Ligandı)
CRAB	:	HyperCalcemia, Renal Failure, Anemia, Bone Lesions (Hiperkalsemi, Böbrek Yetmezliği, Anemi, Kemik Harabiyeti)
ISS	:	International Staging System (Uluslar arası evreleme sistemi)
DC	:	Dendritic Cell (Dendritik Hücre)
NK hücreleri	:	Natural Killer Cells (Doğal Katil Hücreler)
IGF	:	Insulin-like growth factor (İnsülin-benzeri Büyüme Faktörü)
SDF-1α	:	Stromal-Derived Factor-1 alpha (Stromal-Kökenli Büyüme Faktörü-1 alfa)
IL-2	:	Interleukin-2
IL-6	:	Interleukin-6
Ifn-γ	:	Interferon gamma
CD	:	Cluster of Differentiation
MHC	:	Major Histocompatibility Complex
TGF-β	:	Transforming Growth Factor-beta
TCR	:	T Cell Receptor (T Hücre Reseptörü)
CTL	:	Cytotoxic T Lymphocyte (Sitotoksik T Lenfositleri)

Th	:	Helper T cell (Yardımcı T Hücresi)
TNFR	:	Tumor Necrosis Factor Receptor (Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü)
DR	:	Death Receptor (Ölüm Reseptörü)
DcR	:	Decoy Receptor (Yalancı Reseptör)
OPG	:	Osteoprotegrin
FSC	:	Forward-Scatter
SSC	:	Side-Scatter
MFI	:	Mean Fluorescent Intensity (Ortalama Floresan Yoğunluğu)
ABC	:	Antibody Bound per Cell (Hücre Başına Düşen Antikor Sayısı)
QFCM	:	Quantitative Flow Cytometry (Nitel Akış Sitometrisi)

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. MM nedenli ölüm riskinin cinsiyet ve ırka göre dağılımı (a) ve M görülme sıklığının cinsiyet ve yaşa göre dağılımı.	4
2.2. Örnek bir MM kemik iliği yayması.	5
2.3. Ölümcül Ligand Reseptörleri	15
3.1. QuantiBrite Boncuklar Okutulduktan Sonra İzlenen Protokol:	18
4.1. FasL ve TRAIL yüzey ekspresyonları akış sitometri yöntemi ile gösterilebilmektedir.	20
4.2. Kontrol grubu ve hasta grubuna ait lenfosit popülasyonlarının FasL ekspresyon oranları arasında belirgin farklılık gözlenmiştir.	22
4.3. CD3+ hücre popülasyonlarındaki FasL ekspresyonları.	23
4.4. Kontrol grubu ve hasta grubuna ait lenfosit popülasyonlarının ortalama TRAIL ekspresyonları arasında belirgin farklılık gözlenmiştir.	24
4.5. CD3+ hücre popülasyonlarındaki TRAIL ekspresyonları.	25
4.6. Kontrol grubu ve hasta grubuna ait lenfositler, hücre başına düşen FasL ve TRAIL antikör sayısına göre değerlendirildiğinde farklı ekspresyon profilleri gözlemlendi.	26
4.7. CD3+ hücre popülasyonlarındaki FasL ABC değerleri	28
4.8. Kontrol grubu ve hasta grubuna ait lenfositlerin ölümcül ligand pozitiflik oranları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi.	29
4.9. Kontrol grubu ve hasta grubuna ait lenfositlerin ölümcül ligand pozitiflik oranları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi.	30

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Durie-Salmon Sınıflandırma Sistemine Göre MM Evreleri	5
2.2. Uluslar arası Evrelendirme Sistemi'ne (ISS) Göre MM Evreleri	7
2.3. MM'de en sık karşılaşılan sitogenetik bozukluklar	8
3.4. Çalışmaya Dahil Edilen Hasta ve Kontrol Profilleri	16
4.5. FasL MFI Ortanca Değerleri	21
4.6. TRAIL MFI Ortanca Değerleri	24
4.7. Hasta ve Kontrol Gruplarına Ait Lenfositlerde Bulunan Ortalama FasL Protein Miktarları	27
4.8. Hasta ve Kontrol Gruplarına Ait Lenfositlerde Bulunan Ortalama TRAIL Protein Miktarları	27
4.9. FasL ve TRAIL'in yüzey ekspresyonu eşzamanlıdır.	31

GİRİŞ VE AMAÇ

Ölümöl ligandlar, bağışıklık sisteminin anti-tümör etkinliğinde önemli bir role sahiptir. Grubumuz tarafından daha önce yapılan çalışmalarda, birçok farklı kanser tipinde tümör hücrelerinin yüzeyindeki TRAIL ve TRAIL reseptör ekspresyon profillerinin hastalık gidişatı hakkında bilgi verebileceğı gösterilmiştir. Diğer gruplar tarafından yapılan çalışmalar sonucunda da, aynı durumun Fas ve FasL için de geçerli olduğı belirlenmiştir. Tümör hücrelerinin yüzeyindeki ölümöl ligand ekspresyonu metastaza yatkınlık ve bağışıklık sisteminden kaçışa yol açmak suretiyle hastalık gidişatını negatif yönde etkilerken; ölüm reseptörlerinin varlığı bu hücrelerin apoptoza yatkınlığını temsil eder. Tümör hücrelerinin yüzeyindeki ölüm reseptörleri iyi prognozla ilişkilendirilse de, bu reseptörler aracılığıyla apoptozun indüklenbilmesi için, savaşçı lenfositlerin yüzeyinde de ölümöl ligandların sentezleniyor olması gerekir. MM hücrelerinin yüzeyinde, Fas ve TRAIL reseptörlerinin sentezlendiğı bilinmektedir. Fakat MM hastalarına ait bağışıklık sistem hücrelerinin yüzeyindeki ölümöl ligand profilleri hakkında herhangi bir bilgi henüz mevcut değildir. Bu nedenle biz de çalışmamızda MM hastalarına ait sitotoksik lenfositlerde FasL ve TRAIL ekspresyon profillerini belirlemeyi hedefledik. Hipotezimize göre, myelom hücrelerinin ölüm reseptörlerini sentezliyor olmalarına ve in vitro ortamda ölümöl ligand aracılı apoptoza yatkınlıklarına rağmen vücut içerisinde sağ kalabilmesi, MM hastalarına ait lenfositlerin ölümöl ligand yüzey ekspresyonunun sağlıklı kontrollere nazaran azalmış olmasından kaynaklanabilir.

GENEL BİLGİLER

2.1. Multiple Myeloma

2.1.1. Tarihsel Süreçte Multiple Myeloma:

Multiple Myeloma (MM), antik çağlardan bu yana insanoğlunun yüzleşmek zorunda kaldığı ölümcül bir hastalıktır. 1932 yılında Ritchie ve Warren tarafından, milattan önce 800'lü yıllara kadar uzanan insan fosillerinde yapılan incelemeler, muhtemel MM vakalarının saptanmasını sağlamıştır. Bu yayını takiben 1941 ve 1967 yıllarında yapılan çalışmalarda da Amerika kıtasındaki birçok farklı bölgede, M.Ö. 1300'lü yıllara kadar bu hastalığın kalıntıları bulunmuştur. Elde edilen bilgiler, 10 yaşından 61 yaşına kadar değişkenlik gösteren, özellikle de 40'lı yaşlara ait bireylerin fosillerinde MM benzeri semptomlar gözlemlendiğini ortaya çıkarmıştır ki bu da, MM görülme yaşının zamanla artış gösterdiğini düşündürmektedir[1].

Yüzyıllardır insanların hayatını zorlaştıran bu hastalık, 1800'lü yıllarda tıp doktorlarının dikkatini çekmeye başlamıştır. MM üzerine yapılan çalışmaların miladı sayılabilecek olay, 1845 yılında 46 yaşındaki hasta Alexander McBean'ın idrar örneğinin doktoru Thomas Watson tarafından, tanınmış bir kimyager olan Henry Bence Jones'a gönderilmesidir. Bence Jones, opak bir görünüme sahip olması, asidik özellik göstermesi ve 1,035'lik yoğunluğu nedeniyle Watson'un incelenmesini istediği bu idrar örneğinde 60g/dl civarında bir proteinin varlığını saptamış ve bu proteinin de bir albumin oksidi (hidrate albumin deutoksit) olduğunu belirlemiştir. Bu protein, onlarca yıl sonra MM tanısında bir belirteç olarak kullanılacak ve "Bence-Jones proteini" olarak adlandırılacaktır. 1 Ocak 1846'da McBean'ın hayatını kaybetmesini takiben yapılan otopside "kaburgaların bistüri ökçesi ile dokununca bile kırıldığı", "kaburgaların iç kısmının kan kırmızısı ve kaygan jelatinimsi bir madde ile kaplı olduğu" ve "kırılğan sternum" saptanmış, yani kemik tutulumu gözlenmiştir. Jelatinöz madde üzerinde yapılan incelemede ise [2], bu maddenin içerisinde alyuvarların 1,5-2 katı büyüklüğünde ve oval yapıda çekirdekli hücreler bulunduğu saptanmıştır. Ayrıca karaciğerinde de ödem saptanan McBean'ın ölüm nedeni ise kayıtlara "albuminüriye bağlı atrofi" olarak geçmiştir.

McBean hastalığı olarak bilinmeye başlanan bu semptomlara sahip bir diğer hasta 1867 yılında Hermann Weber tarafından rapor edilmiştir. Bu raporda bahsedilen 40 yaşındaki hasta, McBean'ın şikayetlerine benzer bir şekilde sürekli tekrarlayan soğuk algınlıkları ve göğüs kafesinde ağrı ile konsültasyon istemiş, ilerleyen dönemlerde ise bel ağrısı (lumbar ağrı), sternumda deformasyon, kamburluk ve küçük baş hareketleri ile bile şiddetlenen omuz ve ense ağrısı ortaya çıkmıştır. Doktora başvurduktan 3,5 ay sonra kaybedilen hastanın post-mortem analizinde sternumun sarkoma benzeri kırmızı/gri bir madde ile kaplı olduğu, bu durumun pelviste, birçok kaburga ve omurda da söz konusu olduğu, ayrıca böbrek ve dalakta amiloidoz gözlemlendiği fark edilmiştir.

Beş sene sonra, 1872’de William Adams tarafından sunulan bir vaka raporunda ise üst ve alt ekstremitelerdeki uzun kemiklerde ağrı, ateş ve kilo kaybı şikayetleri ile doktora başvuran bir hastadan bahsedilmektedir. Post-mortem inceleme için hasta masaya alınırken yapılan küçük temasla bile sol femur kırılmış; kemik korteksinin yerini homojen, yumuşak bir jelatinöz maddenin aldığı belirlenmiştir. Bu jelatinöz maddenin mikroskopik incelemesi sonucunda küresel ve oval hücreler ile kaplı olduğu fark edilmiştir. Raporda bahsedilen bir diğer önemli nokta ise karaciğer ve böbreklerde gözlenen amiloidozdur.

“McBean’ın hastalığı” olarak uzun bir süre tanınan hastalığın “Multiple Myeloma” olarak adlandırılması ise 1873 yılında J. von Rustizky tarafından gerçekleştirilmiştir. Von Rustizky, 47 yaşındaki hastasının şakağında Mayıs 1972’den itibaren büyümeye başlayan ve yumruk büyüklüğüne erişince göz felcine (oftalmoflejiye) neden olan bir kitleden bahsetmiştir. Hastanın ölümünden sonra yapılan otopside, vertebraya yerleşik 8 farklı tümör bulunmuş ve bunlar von Rustizky tarafından “yumuşak ve kırmızı birçok myelom” olarak tanımlanmıştır. Mikroskopik inceleme sonrasında ise daha önce rapor edilen vakalarda olduğu gibi bu vakada da gözlenen jelatinöz maddenin tek çekirdekli yuvarlak hücrelerden oluştuğu ve bu hücrelerin çekirdeğinin membrana yakın bir şekilde, periferde durduğu belirlenmiştir.

1883 yılında W.Kühre, akut kemik yumuşaması (osteomalazi) olduğu düşünülen 40 yaşındaki hastasının idrar yoğunluğunun da daha önce bahsedilen MM vakalarına benzer olduğunu fark etmiş ve idrar örneğindeki proteini izole etmiştir. Elde ettiği “albumosurie” proteininin Bence Jones proteini ile benzer atom oranları içermesinden dolayı kamburluk, çığneme güçlüğü ve paraliz şikayetleri ile gelmiş olan bu hastanın da bir MM vakası olduğu sonucuna varmıştır.

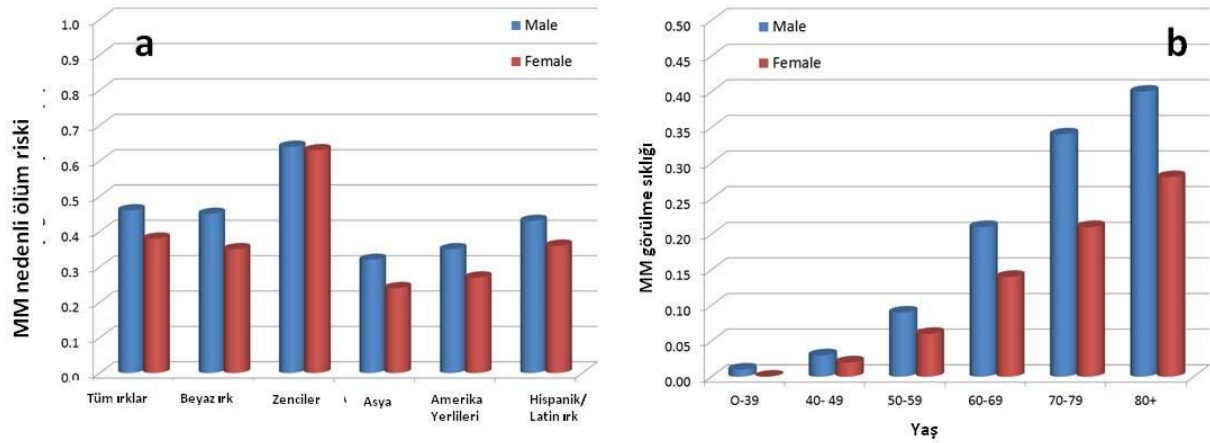
MM hastalığının, günümüzde patogenezi büyük ölçüde bilinen hastalıklar arasına katılmasında belki de en büyük paya sahip olan isim, Otto Kahler ise, konsültasyonu altındaki bir tıp doktorunda gözlediği semptomları geniş bir şekilde özetleyerek, bugün MM tanısında kullanılan tabloyu ortaya koymuştur [3].

2.1.2. Myeloma Tanımı, Biyolojisi ve Mikroçevre

Multiple Myeloma, hematolojik kanserlerin yaklaşık %10’unu oluşturur ve tüm kanser ölümlerinin %2’sinden sorumludur [4]. 2010 kanser istatistiklerine göre, 2010 yılı içerisinde 20180 Amerika Birleşik Devletleri vatandaşının multiple myelomaya yakalanacağı ve 10650 kişinin de bu hastalık nedeniyle hayatını kaybedeceği tahmin edilmekteydi [5]. 2012 yılında ise bu rakamlar 21700 yeni vaka ve 10710 MM kaynaklı ölüm olarak öngörülmüştür [6].

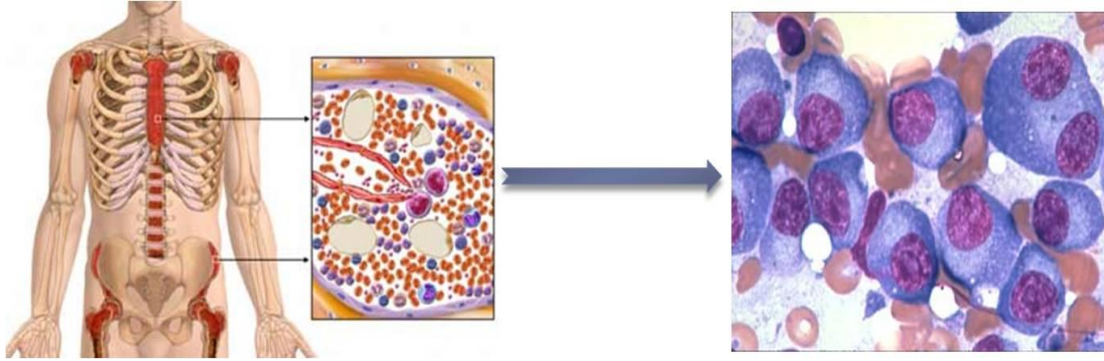
Multiple Myeloma hakkında yıllarca süren deneyimden sonra elde edilen gözlemlerden biri, MM görülme sıklığının ırklara bağlı olarak değişiklik gösterebildiğidir. MM vakalarına sırasıyla en sık siyahilerde, Havai yerlilerinde, İsrail Yahudilerinde, Kuzey Avrupa’lı ve Amerikalı/Kanadalı bireylerde rastlanırken; Ortadoğu ülkelerinde, Japonya ve Çin’de hastalık insidansı en düşük olarak rapor edilmiştir [7-10]. Bundan bağımsız olarak, bütün ırklarda erkeklerde MM görülme ihtimalinin kadınlara nazaran daha yüksek olduğu bilinmektedir [4, 5].

Multiple Myeloma, genellikle orta yaşı üzerindeki bireylerde ortaya çıkmaktadır. Tanı konma yaşı erkeklerde ortalama 62, kadınlarda ise ortalama 61'dir. Hastalığa 40 yaşın altındaki bireylerde de rastlanabilmesine rağmen bu olasılığın yaşlı popülasyona nazaran düşük olduğu bilinmektedir[11]. Bu durumun altında yatan muhtemel nedenlerden birinin, MM öncülü sayılan ve 25 yaş üstü bireylerin %1'inde görülen Önemi Bilinmeyen Monoklonal Gamopati (MGUS)'nin senede %0,5-3 hızla MM'ye ilerlemesi olabileceği iddia edilmektedir [12].



Şekil 2.1. MM nedenli ölüm riskinin cinsiyet ve ırka göre dağılımı (a) ve M görülme sıklığının cinsiyet ve yaşa göre dağılımı. Tablolar US National Cancer Institute's Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) Veritabanı'ndan alınmıştır.

Bir monoklonal gammopatinin MM olarak tanımlanabilmesi için hastaların kemik iliğinde %10'dan fazla klonal plazma hücre birikiminin ve serum ya da idrar örneklerinde monoklonal protein varlığının gösterilmesi gerekmektedir. Bu nedenle MM'den şüphelenilen durumlarda, serum kalsiyum, kreatinin, laktat dehidrojenaz (LDH), beta-2 mikroglobulin, ve albumin parametrelerinin de ölçüldüğü tam kan sayımını takiben; elektroforez yöntemi ile kan veya 24 saatlik idrar örneklerinde M protein var olup olmadığının (eğer varsa seviyesinin) belirlenmesi gerekmektedir. Nitekim MM hastalarının yaklaşık %93'ünde serum, %75'inde ise idrar M proteinine rastlanmaktadır [13]. Hastaların %2'sinin ise serum yahut 24 saatlik idrar örneklerinde M proteinine rastlanmamaktadır. Bu durumda, immünoфикsasyonlu serum serbest hafif zincir analizi ile κ/λ oranının belirlenmesi ile hastaların yaklaşık %98'inde monoklonal paraproteinlerin saptanabildiği bilinmektedir [14]. Bu tetkiklerin ardından gerçekleştirilecek olan kemik iliği aspirasyonu ve biyopsisi ile hem kemik iliğindeki plazma hücre birikim oranının saptanması, kemik iliği hücrelerinin histolojik ve sitogenetik analizlerinin yapılması gerekmektedir. **Şekil 2.2'**de, örnek bir kemik iliği yayması gösterilmiştir. Kemik iliği yayması ile eş zamanlı olarak, iskelet MR görüntüleme yöntemi gibi radyolojik analizlerle de litik kemik lezyonları belirlenmelidir.



Şekil 2.2. Örnek bir MM kemik iliği yayması:

Multiple Myeloma, kemik iliğinde monoklonal plazma hücre birikimi sonrasında ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, MM tanısı koyulabilmesi için hastalardan kemik iliği aspirasyonu yapılmalı ve kemik iliği yayması ile myelom hücre oranı belirlenmelidir.

Bahsedilen tetkiklerden sonra, 3g/dL'den düşük serum M protein konsantrasyonu, kemik iliğinde %10'dan az klonal plazma hücre oranı belirlenen, diğer B hücre proliferatif hastalıklarına dair herhangi bir belirtiye rastlanmayan ve uç organ hasarı gözlenmeyen bireylere Önemi Bilinmeyen Monoklonal Gamopati (MGUS) tanısı konur. M protein konsantrasyonunun 3g/dL'nin üstünde, kemik iliğindeki monoklonal plazma hücrelerinin ise %10'dan fazla olduğu bireylerde ise tanı MM olacaktır. MM, semptomatik ve asemptomatik olabilmektedir. Hastalarda hiperkalsemi (serum kalsiyum >11,5 mg/L), böbrek yetmezliği (serum kreatinin > 1,73mmol/L), anemi (hemoglobin < 10g/dL) veya kemik lezyonlarının (CRAB) varlığı, semptomatik MM'i asemptomatik (smoldering) formdan ayırt etmektedir [15].

MM evrelendirmesinde temel olarak kullanılan iki metottan ilki, 1975 yılında Durie ve Salmon tarafından geliştirilmiş olan Durie-Salmon evrelendirmesidir [13]. Dolaşımdaki immünoglobulin konsantrasyonundan yola çıkarak toplam myeloma hücre sayısının elde edilmesine ve belirlenen tümör kitlesinin kemik lezyon sayısı, serum kalsiyum/ kreatinin konsantrasyonu ve serum ya da üre M protein konsantrasyonu ile ilişkilendirilmesine dayanan bu yöntem MM vakalarını üç temel gruba ayırır. Buna ek olarak her üç grup da 2mg/dL kreatinin eşik konsantrasyon değerine göre A ve B olarak iki gruba ayrılır. Tablo 1'de Durie-Salmon sınıflandırması verilmiştir.

Tablo 2.1. Durie-Salmon Sınıflandırma Sistemine Göre MM Evreleri

EVRE	Kemik Lezyonları, Myelom Oranı	Hemogloblin	Kalsiyum	Kreatinin	M Protein
Evre 1-A	0-1 Lezyon, <0,6x10 ⁶ myelom hücresi/m ²	>10g/dL	Normal	<2mg/dL	Düşük (IgG<5g/dL IgA<3g/dL; İdrar M protein>4g/24h)
Evre 1-B	0-1 Lezyon <0,6x10 ⁶ myelom hücresi/m ²	>10g/dL	Normal	>2mg	Düşük (IgG<5g/dL IgA<3g/dL; İdrar M protein>4g/24h)
Evre 2-A	Evre 1 veya Evre 3 olarak sınıflandırılmayan 2mg/dL'den düşük kreatinin seviyeli vakalar; 0,6x10 ⁶ – 1,2x10 ¹² myelom hücresi /m ²				
Evre 2-B	Evre 1 veya Evre 3 olarak sınıflandırılmayan 2mg/dL'den yüksek kreatinin seviyeli vakalar; 0,6x10 ⁶ – 1,2x10 ¹² myelom hücresi /m ²				
Evre 3-A	Artmış Lezyon, >1,2x10 ¹² myelom hücresi/m ²	< 8,5 g/dL	Yüksek	< 2mg/dL	Yüksek (IgG>7g/dL IgA>5g/dL; İdrar M protein>12g/24h)
Evre-3B	Artmış Lezyon, >1,2x10 ¹² myelom hücresi/m ²	< 8,5 g/dL	Yüksek	> 2mg/dL	Yüksek (IgG>7g/dL IgA>5g/dL; İdrar M protein>12g/24h)

Durie-Salmon evrelendirme sistemi her ne kadar biyolojik durum ve tümör yükü hakkında gerekli bilgileri verse de, radyografi sonuçların göre litik lezyonların yorumlanmasında öznel farklılıkların söz konusu olabilmesi nedeniyle yeni bir evrelendirme sistemi geliştirilmesi gerekmiştir. Bu nedenle, 1981-2002 yılları arasında Kuzey Amerika ve Asya'daki 15 farklı merkeze başvurmuş olan toplamda 10750 semptomatik MM hastası beta-2 mikroglobulin ve serum albumin konsantrasyonlarına göre ayrılarak Uluslar Arası Sınıflandırma Sistemi (ISS) geliştirilmiştir [16]. Kolay bir şekilde uygulanabilen tetkiklerden yola çıkarak hasta sağ kalımı hakkında bilgi verebilen bu sistem, son dönemde Durie-Salmon sisteminin yerini almıştır. Durie-Salmon evreleme sistemine nazaran tekrar edilebilirliği yüksek olan bu sistemin en ciddi dezavantajlarından biri ise tümör yükü hakkında yeterli fikir verememesidir. ISS'e göre MM evreleri, **Tablo 2**'de özetlenmiştir.

Tablo 2.2. Uluslar arası Evrelendirme Sistemi'ne (ISS) Göre MM Evreleri

EVRE		β 2-mikroglobulin	Albumin	Ortalama Sağ Kalım
Evre I		<3,5mg/L	$\geq$ 3,5g/dL	62 ay
Evre II	Kategori1	<3,5mg/L	<3,5mg/dL	44 ay
	Kategori 2	3,5 mg/L – 5,5mg/L	> 0	
Evre III		$\geq$ 5,5mg/L	> 0	29 ay

2.1.3. Multiple Myeloma Etiyolojisi

Birçok farklı kanser tipi gibi, multiple myeloma da kompleks bir hastalık olarak değerlendirilmekte; kalıtsal risk faktörlerinin çevresel etmenlerle bir araya gelmesi sonrasında plazma hücrelerinin kanserleşmesi sürecinin başladığı düşünülmektedir.

MM riskinin kalıtsal yönüne dair çalışmalardan biri 2005 yılında yayınlanan ve 218 MM hastasının birinci derece yakınlarını inceleyen araştırmadır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre MM hastalarının birinci derece yakınlarında MGUS görülme riskinde anlamlı bir artış saptanamamışken MM görülme riskinde belirgin bir artış olduğu belirlenmiştir [17]. Yine aynı senede yayınlanan başka araştırmalar da MM hastası bireylerin yakınlarında hem MM, hem de diğer kanser türlerinin görülmesi riskinin artmış olduğu göstermiştir [18]. Türkiye’de yapılan bir araştırmada da, MM hastası bireylerin yakınlarında MM geliştirme olasılığının yüksek olduğu belirlenmiş, hatta bu kalıtsal aktarımın otozomal dominant bir şema sergilediği ifade edilmiştir[19].

Kalıtsal aktarımdan da ziyade, MM patogenezinde en çok dikkati çeken hususlardan biri çevresel etmenlere bağlı olarak gelişen moleküler değişikliklerdir. Bahsedilen moleküler değişiklikler; kromozomal yeniden düzenlenmeler, belirli genlerde sonradan kazanılan mutasyonlar ya da epigenetik değişiklikleri kapsayabilir.

Yapısal ya da sayısal kromozom bozukluklarına, MM tümörlerinin büyük bir çoğunluğunda rastlanır [20]. Sayısal anormallikler bazında bakıldığında, MM hastalarında hiperdiploidi, hipodiploidi, psödodiploidi ya da tetradiploidi gibi durumlarla karşılaşılabilirdiği görülür [21]. Hipodiploidi vakalarında görülen 13q delesyonları, hatta bazı vakalarda karşılaşılan 13. kromozom monozomileri, yaygın olarak kötü prognozla ilişkilendirilmektedir [22]. 13q delesyonları sonucunda, tümör baskılayıcı genler RB1 ve D13S319’un susturulması söz konusu olmakta ve bu durum kötü prognozla ilişkilendirilmektedir.

Kromozom sayısal bozukluklarının yanı sıra, daha da sık rastlanan bir diğer kromozomal yeniden düzenlenme grubu ise translokasyonlardır. Kanser hücrelerinde biriken mutasyonlar [23], DNA’da kırıklara yol açarak immunoglobulin bölgesi başta olmak üzere birçok gen bölgesinde parça değişimlerine yol açabilir. Bu değişiklikler, post-germinal B hücrelerinin kemik iliğine göçünden önce gerçekleşir ve somatik hipermutasyon biriktirmiş B hücrelerinin kemik iliğinde stromal hücrelerle karşılaşması sonrasında hücreler olgunlaşarak plazmablastlara dönüşür [24]. Oluşan plazmablastların serum elektroforezinde tespit edilebilecek miktarda M protein üretebilmesi için, kemik

iliğinde yaklaşık bir milyar (10^9) hücrenin birikmesi gerekir.

Beklenebileceği üzere, MM gelişimi esnasında plazma blastlarında meydana gelen genetik tabanlı moleküler değişikliklere en çok immunoglobulin gen lokusunda rastlanır. Örneğin IgH geni lokusu olan 14. kromozomun q32 bölgesi, kromozomal translokasyonlara en çok maruz kalan bölgedir. Özellikle hiperdiploid olmayan MM hücrelerinin yaklaşık %84'ünde bu bölgeyi de içine alan kromozomal translokasyonlar rapor edilmiştir [25].

IgH lokusu 14q32 ile birçok farklı kromozomal bölge arasında translokasyon söz konusu olabilmektedir. Özellikle en sık rastlanan translokasyonlar; 4p16, 6q21, 11q13 ve 16q23 bölgeleri ile 14q32 lokusu arasında gerçekleşmektedir. Bu translokasyonlar sonucu ekspresyon seviyesi değişen genler ve bu translokasyonların prognoza yansması, tablo 3'de özetlenmiştir.

Tablo 2.3. MM'de en sık karşılaşılan sitogenetik bozukluklar

Translokasyon	Etkilenen gen	Ploidi	Görülme Sıklığı	Prognoz
t(4;14)(p16;q32)	FGFR3/MMSET	Diploid	%15	Kötü [26, 27]
t(14;16)(q32;q23)	c-maf	Non-hiperdiploid	%5	Kötü [28, 29]
t(6;14)(q21;q32)	CCND3	Non-hiperdiploid	%3	İyi [30]
t(11;14)(q13;q32)	CCND1; MYEOV	Diploid non-hiperdiploid	%16	İyi [31]

Kromozomal translokasyon sonrası ekspresyon seviyesi değişiklik gösteren genlerin yanı sıra, bazı genlerin ifadesinde translokasyon olmaksızın da değişiklik oluşabildiği bilinmektedir. Örneğin MM vakalarının %10-40'ında K-Ras ve N-Ras genlerinde nokta mutasyonlarına rastlanmakta ve bu mutasyonlardan dolayı Ras proteinlerinin aşırı ekspresyonu kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir [32, 33]. Ras genlerinin yanı sıra, DAPK, SOCS1, p15 ve p16 başta olmak üzere 120 genin, nokta mutasyonlarına yahut epigenetik değişikliklere bağlı olarak ekspresyon seviyeleri değişmektedir. Bu değişikliklerden pek çoğunun prognoz ile alakalı bulunması nedeniyle [34, 35], gen ekspresyon profillemesi (GEP) hastalık prognoz belirlenmesinde kullanılmaktadır. Yalnız bu noktada bariz bir sorun, 120 genlik bir panelin her hasta için taranmasının yüklü maliyetidir. Üstelik sağlıklı plazma hücrelerinin de myelom hücrelerine kontamine olup sonucu değiştirebilmesi riski de elde edilecek olan sonuçların güvenilirliğini etkilemektedir.

MM hastalarında genomik ve kromozomal bozuklukların yanı sıra karşılaşılan

bir diğerk sorun ise, bağışıklık sisteminde karşılaşılabilen kusurlardır.

2.2. Multiple Myeloma ve Bağışıklık Sistemi

Bağışıklık sistemi, organizmaların patojenlere, herhangi bir enfeksiyon sonrası yabancılaşmış hücelere yahut kanserleşerek morfolojik değışiklik geçirmiş hücelere karşı vücudumuzun savunma mekanizmasıdır. Çoğu kanser tipinde kanserli hücelerin sağ kalabilmesi bağışıklık sistemi tarafından cevap uyandırılmamasına bağlıdır.

Tümör hücelerine karşı bağışık sistem atağının söz konusu olduğuna dair ilk hipotez, 1908 yılında Paul Ehrlich tarafından ortaya atılmıştır. Ehrlich tezinde, kanser hücelerine ya da parazitik enfeksiyonlara karşı direnç mekanizmasında; yani bağışıklık sisteminde kusur bulunan organizmalarda spontan tümör oluşumunu göstermiştir [36]. Hipotezini desteklemek için yaptığı çalışmada, 60 nude fare jenerasyonuna tümör hücelerini subkutan olarak enjekte etmiş ve bu yolla transplante edilen hücelerin farklı dokulara göç ederek morfolojik değışim gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu çalışmadan 49 yıl sonra ise, Southam ve arkadaşları, kanser hastalarına ve sağlıklı bireylere tümör hücre hattı naklettiklerinde sağlıklı bireylerde inflamasyon kaynaklı hücre reddi oluşabildiğini, bu sayede sağlıklı bireylerin bu hücelere karşı direnç oluşturarak kanser oluşumundan kurtulabildiğini göstermişlerdir. Kanser hastalarına ise sağlıklı epitel hücre hatları nakledildiğinde bile, bu hücelerin neoplastik görünüm kazanarak tümör oluşumuna yol açtığı yine aynı çalışmada belirtilmiştir [37]. 1964 yılında, Sir MacFarlane Burnett, tümöre karşı bağışıklık direnci konseptini tanımlayıp “immune surveillance” adını vermiş ve bu denetim mekanizmasını etkileyen faktörleri gruplandırmıştır [38]. 2000 yılında ise, Hanahan, bağışıklık sistem kusurlarını, kanseri ayırt etmede kullanılabilecek 7. nitelik olarak olarak tanımlamıştır [39]. Bugün ise; kanser ve bağışıklık sistemi arasındaki ilişki “immunosurveillance”, “immunosubversion” ve “immunoselection” olmak üzere üç alt grupta tanımlanmaktadır [40]. Immuno-surveillance ise zaman bazlı değerlendirildiğinde; eliminasyon, denge ve kaçış fazlarına ayrılmaktadır [41]. Eliminasyon fazı, esasen Sir MacFarlane Burnett tarafından tanımlanan kıstaslardan oluşmaktadır. Bu fazda bağışıklık sistemi, tümör özgül antijenler ya da hücre morfolojisindeki değışimler sayesinde kanser hücelerini tanıır ve bu hüceleri yok etme yoluna gider. Bağışıklık sisteminin bu esnada yeterli aktivite gösterememesi, tümör hücelerinin zamanla bağışıklık sistem hücelerine karşı direnç kazanması, dolayısıyla da denge fazına geçilmesine neden olur. Denge fazının tümörü destekler biçimde sürmesi, zamanla birçok farklı tümör varyantının oluşumuna; bağışıklık sisteminden tam olarak kaçmayı başarabilen herhangi bir tümör varyantının çoğalarak ortama regülatör hüceleri çağırması ve bağışıklık sisteminin bölgede tam olarak baskılanmasına yol açar. Esasen hastalara kanser tanısının konabilmesi, bu döneme tekabül eder.

Gerek solid gerekse hematolojik kanserlere sahip bireylerin çoğunda olduğu gibi, MM hastalarının da bağışıklık sistemlerinin tümör denetim mekanizmalarında çeşitli bozukluklara rastlanmaktadır. Aslında MM hücelerinin biriktiği kemik iliğı, aynı zamanda birçok bağışıklık sistem hücresine de ev sahipliğı yapmaktadır ki bu da MM hücelerine karşı bağışıklık sistem savunmasının oluşması gerektiğini düşündürmektedir. Nitekim kanserin yedinci ayırt edici özelliğı olan bağışıklık baskılayıcı mikroçevre, MM hastalarının kemik iliklerinde de söz konusudur [42].

MM hastalarının bağışıklık sistemlerindeki en belirgin kusur, dendritik hücrelerde (DC) gözlemlenmektedir. Kemik iliğinde bulunan hücrelere göz atıldığında, osteoblastlar, osteoklastlar, stromal hücreler, endotelial hücreler, adipositler, eritroid hücreler, hematopoetik kök hücreler ve lökositlere rastlanmaktadır. Bu hücrelerin yanı sıra mikroçevrede bu hücreleri bir arada tutan ekstraselüler matriks proteinleri fibronektin, kolajen, laminin ve osteopontin de yüksek oranlarda bulunmaktadır [43]. MM hücreleri kemik iliğinde birikip oradaki mikroçevre ile ilişkiye girdiğinde, yukarıda belirtilen BM hücreleri, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1), Stromal Kökenli Faktör 1- alfa (SDF-1 α), tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) ve IL-6 gibi sitokinleri salgılar [44]. Bu proteinler, MM hücre sağ kalımı, hücre çoğalımı, migrasyonu ve ilaç dirençliliği gibi çok önemli kanser destekleyici durumlara yol açarlar [45]. Kanser destekleyici bu etkilerin yanı sıra yine aynı sitokinler, bağışıklık sistem baskılanmasına da yol açabilmektedir. Kemik iliğindeki dendritik hücre aktivitesinin baskılanmasında en önemli rol, MM mikroçevresinde, gerek osteojenik hücreler, gerekse MM hücreleri tarafından salgılanabilen IL-6'ya biçilmiştir.

Bahsedilen faktörler, dendritik hücrelerde hem hücre sayısındaki azalma, hem de fenotipik/fonksiyonel bozukluklara yol açabilmektedir. Bu durum, MM hastalarına ait dendritik hücrelerin T hücreleri uyarma kapasitesinin sağlıklı bireylere nazaran çok daha düşük hale gelmesine neden olmaktadır [46]. Dendritik hücreler tarafından T hücrelerine antijen sunumu ve bu yolla T hücre uyarımındaki kusurlar, dendritik hücrelerin IL-6 antikorları ile muamele edilmesiyle normale dönmektedir. Bu durum, kemik iliğindeki yüksek IL-6 konsantrasyonunun dendritik hücre fonksiyonelliği üzerindeki etkisini belirgin bir şekilde ortaya koymaktadır [47, 48]. IL-6 aynı zamanda, MM hücrelerinde Bcl-xL ve Mcl-1'in aşırı ekspresyonuna yol açarak, MM hücrelerinin apoptozunu engellemektedir [49]. Her ne kadar DC aktivitesini baskılayan en dominant faktör IL-6 olsa da, MM hastalarının kan dolaşımında yüksek konsantrasyonlarda bulunan Beta-2 mikroglobulin de yine DC aktivitesinde düşüşe yol açabilmektedir [50].

DC'lerin azalmış antijen sunum kapasitesinin yanı sıra, bu hücreler tarafından salgılanan sitokinlerin ve MM-DC hücrel bağlanması sonrasında MM hücre içi sinyalleşmesinde meydana gelen değişikliklerin myeloma hücre klonal çoğalımını arttırdığı bilinmektedir [51]. Ayrıca MM-DC etkileşiminin bir diğer etkisi de DC morfolojisi üzerinde gerçekleşmekte ve bu hücreler osteoklast-benzeri morfolojiye farklılaşım geçirerek myeloma ilintili kemik lezyonlarını; dolayısıyla da hastalık ciddiyetini arttırmaktadır [52, 53].

DC hücrelerindeki fonksiyonel kusurların MM hastalarında bu kadar bariz oluşu, ilaç dirençli ve tekrarlayıcı MM hastalarının tedavisinde bu hücrelerdeki kusurların düzeltilmesine yönelik çalışmalara kapı açmıştır. DC antijen sunum mekanizmalarındaki bozuklukların üstesinden gelmek adına geliştirilmeye çalışılan stratejilerden biri; dendritik hücreleri antijen yüklenerek gerçekleştirilecek adjuvan immünoterapidir. [54-56]. DC bazlı MM immünoterapisinde geliştirilmeye çalışılan bir diğer yaklaşım ise, myeloma-DC füzyon hücreleri tarafından anti-tümör etkinliğin uyandırılmasıdır [57].

Tahmin edilebileceği üzere, MM şiddetini etkileyen immunojenik faktörler sadece DC kökenli değildir. Zira dendritik hücrelerin fonksiyonelliğinin azalması, bu hücrelerin antijen sunum yeteneğindeki, dolayısıyla da T hücre uyarımındaki

bozunumları ile karakterizedir.

Beklenebileceği üzere, bağışıklık sisteminin efektör lenfositleri olan T ve NK hücrelerinde oluşan bozukluklar; malign hale gelmiş hücre klonunun yayılımını kolaylaştırarak kanserleşmede rol oynayabilmektedir; bu nedenle de kanser prognozu üzerinde etki göstermektedir [58].

2.2.1. T Lenfositleri ve MM

T hücrelerini diğer lenfositlerden ayıran en önemli özelliklerinden biri, olgunlaşma süreçlerini timusta tamamlamalarıdır [59]. Kazanılmış (adaptif) bağışıklık sistemine mensup T hücreleri, kansere yahut diğer patojenlere karşı vücut savunmasının en önemli elemanlarındanıdır. Kemik iliğindeki ortak lenfoid progenitörden köken alarak timusta gelişen T hücreleri; iki farklı soya ayrılarak, reseptör tiplerine göre $\alpha\beta$ ve $\gamma\delta$ T hücreleri şeklinde gelişimlerini sürdürürler. Kan dolaşımındaki T hücrelerinin yaklaşık %95'ini teşkil eden $\alpha\beta$ T hücreleri, yüzeylerindeki CD3 proteini ile diğer lenfositlerden ayrılırlar ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde farklı roller oynayan alt grupları kapsarlar. Bu gruplar, hücre yüzeyinde CD8 proteini sentezleyen CD3+CD8+ sitotoksik T lenfositleri (CTL), CD4 proteini sentezleyen CD3+CD4+ yardımcı T hücreleri (Th1, Th2, Th17 ve foliküler T hücreleri), CD56 proteini sentezleyen CD3+CD56+ NKT hücreleri ve düşük afiniteli IL-2 reseptörü CD25'i sentezleyen CD3+CD4+CD25+ regülatör T hücreleri (Treg)'dir. Th1 hücreleri, IFN- γ , TNF- α , IL-2 gibi sitokinleri salgılayarak inflamasyon oluşturmak suretiyle hücrel immüniteyi aktive etmek; Th2 hücreleri IL-4, IL-5, IL-10 ve IL-13 gibi inflamasyon durdurucu sitokinleri salgılamak ve antikor üretimine yardımcı olmaktan sorumluyken [60]; Th17 hücreleri ise IL-17 salgılayarak inflamasyon tabanlı doku hasarı ve otoimmün reaksiyonlara sebep olmaktadır [61].

$\gamma\delta$ T hücrelerinin aksine, $\alpha\beta$ T hücreleri Majör Histokompatibilite Kompleksleri (MHC) tarafından tanıtılan antijenleri tanıyarak aktive olur ve tepki gösterirler [62]. CD4+ yardımcı T hücreleri MHC-II sınıfı tarafından tanıtılan peptidleri, CD8+ sitotoksik T lenfositleri ise MHC-I sınıfı tarafından tanıtılan peptidleri tanırlar. Klasik MHC moleküllerinin yanı sıra, klasik olmayan MHC proteinleri de hücrel bağışıklık sistemine antijen sunumunda görev alabilirler; nitekim NKT hücreleri klasik olmayan MHC molekülü CD1d tarafından sunulan antijenleri tanıyarak aktive olurlar [63].

Sitotoksik T lenfositleri, hedef hücreyi, perforin ve granzim A/B içeren granüllerin kalsiyum bağımlı salınımı ile ya da ölümcül ligand (özellikle FasL) aracılı apoptoz indüksiyonu ile öldürebilirler [64][14]. Perforin/granzim bağımlı granüler sitotoksitenin gerçekleşebilmesi, TCR'ler tarafından hedef hücre yüzeyinde bulunan MHC (diğer adıyla insan lökosit antijeni, HLA) proteinlerinin ya da bunlar tarafından sunulan peptidlerin tanınmasına bağlıdır. Hedef hücre yüzeyinde HLA (MHC) sentezinin yeterli seviyelerde olmaması durumunda ise, T hücreleri granüler sitotoksiste gösterememektedir.

2.2.1.1. Multiple Myeloma'da Gözlenen T Hücre Bozuklukları:

T hücre fonksiyonlarındaki bozulmalar, çoğu kanserin ortak noktasını oluşturmaktadır. MM hastalarının T hücrelerine bakıldığında da, gerek yardımcı T hücrelerinin, gerekse sitotoksik T hücrelerinin sağ kalımlarında ya da aktivasyonunda kusurlara rastlanabilmektedir. Dendritik hücre aktivasyonunda olduğu gibi, T hücre

aktivasyonunda da MM mikroçevresi engelleyici rol oynayabilmektedir. Örneğin MM kemik iliğinde yüksek konsantrasyonda bulunan TGF-beta, T hücre proliferasyonunu baskılayan ve T hücrelerinin IL-2'ye cevabını engelleyen en önemli faktörlerden biridir [65].

MM hastalarının T hücreleri, bu hastalığın öncülü sayılan MGUS hastalarına nazaran bozulmuş fonksiyon göstermektedir [66-68]. Her ne kadar önceleri aktivasyon bozukluğunun hücre içi gen ekspresyon profillerinden kaynaklanmadığı düşünülmüş olsa da [66]; Mozaffari ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptığı çalışmada, MM hastalarının T hücrelerinde, hücre aktivasyonunda da rol oynayan yüzey belirteçleri CD28, CD152, CD3 ζ ve hücre içi sinyalleşmenin en önemli elemanları olan p56lck, p59fyn, PI3-k, Zap70 gibi proteinlerin azalmış ekspresyon seviyeleri rapor edilmiştir [69]. Bu durum ise, T hücre reseptörünün sunulan antijeni tanımasından sonra ikincil sinyallerin oluşumunu, dolayısıyla da T hücre aktivasyonunu engellemektedir [70].

Hem CD4+ yardımcı T hücrelerinde, hem de CD8+ sitotoksik T hücrelerinde; fonksiyonel bozuklukların yanı sıra sayısal değişimler oluşabilmekte; bu durum ise bağışıklık sisteminin doğal dengesinin bozulmasına yol açabilmektedir [71]. Mariani ve arkadaşları tarafından yayınlanan çalışmada, T hücre reseptörleri analiz edildiğinde, global T hücre çeşitliliğinin MM hastalarında ciddi bir bozuluma uğradığı belirlenmiştir [72]. Kimi MM hastalarında CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin oligoklonal yayılımları gözlenmekte [73]; oligoklonal hücre yayılımının sitotoksik T lenfositlerinde baskın olması durumunda [74] hasta sağ kalım süresinde artış görülebilmektedir [75, 76]. Oligoklonal T hücre yayılımı her ne kadar sağlıklı bireylerde de yaşa bağlı olarak artış gösterebilse de, paraproteinemisi olan hastalarda bu durumun daha belirgin olduğu rapor edilmiştir [73]. MM hastası bireylerde CD4+ T hücre sayısının azaldığı, CD8+ hücre sayıdaysa bir değişiklik olmadığı, dolayısıyla sitotoksik T lenfositlerinin sağ kalımından ziyade bu lenfositlerdeki fonksiyon kaybının MM patogenezinde rol oynadığını gösteren yayınlar da mevcuttur [13].

T hücrelerinin anti-tümör aktivitesinde rol oynayan bir diğer yolak, ölümcül ligand aracılı hedef hücre apoptozu ile multiple myeloma prognozunu ilişki ise bilinmemektedir. Hâlbuki kanser, apoptoz mekanizmalarının bozulması nedeniyle ortaya çıkan bir bozukluktur ve TNF sitokin ailesine mensup ölümcül ligandlar, tümör hücrelerini etkin bir şekilde apoptoza yönlendirebilmektedirler.

2.3. Ölümcül Ligandlar: FasL ve TRAIL

Tümör Nekroz Faktörü (TNF) ligand protein ailesi olarak da bilinen ölümcül ligandlar, vücut savunmasının önemli bir kısmını oluştururlar. TNF ligand ailesinin bilinen en önemli elemanları TNF α , lenfotoksin β (LT- β), FasL (CD95L), ve TRAIL (TNF-ilişkili Apoptoz İndükleyici Ligand)'dir [77]. TNF ligand ailesinin ismini de aldığı TNF, ilk olarak 1975 yılında, farelere nakledilen sarkomaların hemorajik nekrozuna yol açması sayesinde fark edilmiştir [78]. Bundan 10 yıl sonra ise TNF geni klonlanmıştır [79, 80].

TNF ligand ailesinin bir diğer önemli elemanı olan FasL, 1q23 bölgesinde yaklaşık 8kb'lık bir alan kaplayan CD95L geni tarafından kodlanır [81]. 40kDa büyüklüğündeki bu proteinin özellikle dalak, timus, testis, böbrek ve akciğer dokularında sentezlenebildiği bilinmektedir [82]. TRAIL ise, 281 aminoasitlik bir

protein olarak [83]; 3q26 bölgesindeki 20kb'lik TRAIL geni tarafından sentezlenir [84]. Ölümcül ligandların ekstraselüler bölgeleri birbirine benzerlik gösterirken, sinyal yolaklarını da etkileyen intraselüler bölgelerinde önemli farklılıklar söz konusudur. Hücre içi sinyalleşmeyi sağlayan intraselüler bölgenin uzunluğu FasL'de 80aa, TNF'de 35aa, LT- β 'da 18aa, TRAIL'de ise 17aa'dır [85].

Ölümcül ligandların etkinlik gösterebilmesi için, hedef hücre yüzeyinde bu ligandları tanıyan reseptörlerin bulunması gerekir. Ölümcül ligandların her biri, homotrimer hale geldikten sonra kendilerine özgü reseptörlere bağlanabilirler [86, 87]. TNF'in iki reseptörü bulunmaktadır. Bunlardan ilki olan TNFR1 (CD120a, p55/60), birçok farklı dokuda eksprese olabılırken; TNFR2 (CD120b, p75/80) sadece hematopoietik hücrelerde sentezlenmektedir [88]. TNF reseptörlerinin birçok farklı dokuda sentezlenebilmesi, TNF'in anti-tümör etkinliğinin spesifitesini azaltmakta ve bu sitokini daha ziyade inflamatuvar tepkimelerde önemli kılmaktadır. Zira TNF ve TNFR knock-out farelerin mikrobiyal enfeksiyonlara yatkın olduğu gözlenmiş ve bakteriyel endotoksin verildiğinde inflamatuvar cevabın olması gerekenden daha düşük olduğu tespit edilmiştir [89].

Harici yolakla apoptozu indüklediği fark edilen ilk ölüm reseptörü, Fas (Apo1, CD95)'dir [90, 91]. Fas, TNFR gibi, birçok farklı hücre tipinde sentezlenir [92] fakat *in vivo* ortamdaki temel rolü tehlike sinyali veren (virüs enfekte ya da transformasyon geçirmiş) hücrelerin yok edilmesi üzerinedir. Nitekim Fas mutasyonu olan (gld) farelerde ve FasL mutasyonu olan (lpr) farelerde lenfoproliferatif bozukluklar gözlenmektedir [93]. Diğer önemli ölümcül ligand olan TRAIL ise daha karmaşık bir reseptör silsilesine sahiptir. İnsanda TRAIL'i tanıyan 5 farklı reseptör bulunmaktadır. Bunlardan; DR4 (TRAIL-R1, Apo-2) ve DR5 (TRAIL-R2) ölüm reseptörleri; DcR1 ve DcR2 hücre zarına bağlı yalancı reseptörler; osteoprotegrin (Opg) ise çözünür yapıda bir yalancı reseptördür. Ölüm reseptörleri olan DR4 ve DR5, sitoplazmik bölgelerinde ölüm bölgesi (Death domain, DD) bulundurur [89, 94]. TRAIL'in, DR4 homotrimeri, DR5 homotrimeri veya DR4-DR5 heterotrimerine bağlanması sonucu benzer apoptotik sinyaller oluşur [95]. TRAIL'in diğer reseptörleri ise hücre içi apoptotik sinyal gönderemedikleri için "yalancı reseptörler" (decoy reseptörler) olarak adlandırılırlar. DcR2 (TRAIL-R4), sitoplazmik bölgesi olduğu halde DD'i güdükür ve fonksiyon gösteremez [96]; DcR1 (TRAIL-R3)'in ise sitoplazmik bölgesi, dolayısıyla DD'i yoktur [97]. DcR1 ve DcR2'nin fonksiyonel ölüm bölgelerinin olmaması, bu reseptörlerin herhangi bir apoptotik sinyal gönderememesine; hatta bazı durumlarda ölüm reseptörleri ile yarışa girerek apoptozu engellemelerine neden olur [98]. Osteoprotegrin (OPG, DcR3) ise çözünür yapıdadır ve bu nedenle herhangi bir hücre içi sinyal göndermesi söz konusu değildir [99, 100].

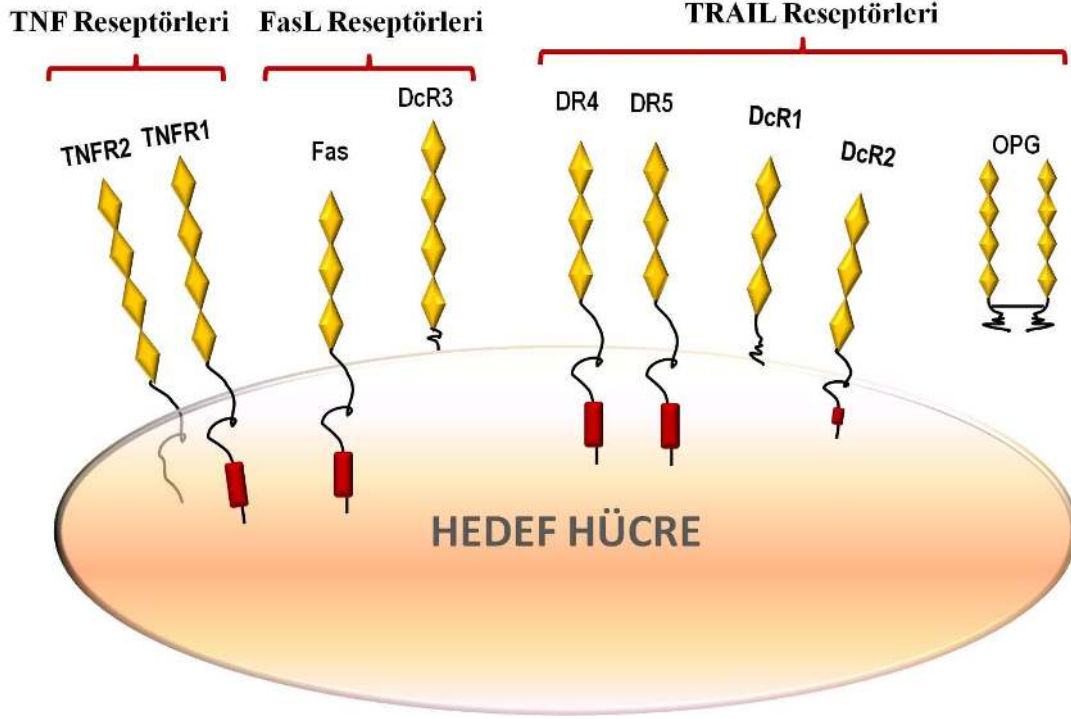
Ölümcül ligandlar, hem hücre zarından geçen (transmembran) proteinler olarak, hem de çözünür yapıda etkinlik gösterebilirler. Çözünür ligand yapısı, özel bir kısım proteolitik işlem sonucunda oluşur [86, 101]. Her ne kadar çözünür ligandlar da vücut savunmasında önemli rol oynuyor olsa da, hücre zarına bağlı ölümcül ligandların, çözünür olanlara nazaran çok daha etkin olduğu bilinmektedir [102]. Bunun nedeni, ölümcül ligand-ölüm reseptörü ilişkisinin transmembran proteinler tarafından, çözünür proteinlere nazaran daha etkin olmasıdır. Örneğin membrana bağlı TNF-alfa hem TNF-reseptör 1 (TNFR1), hem de TNF-reseptör-2 (TNFR2)'yi tanıyabilirken çözünür TNF (sTNF), TNFR2'yi aktive etmek hususunda yeterince

etkili değildir. Benzer şekilde, çözünebilir FasL'nin Fas reseptörünü tetikleyebilmek hususunda membrana bağlı formdan daha az etkin olduğu gösterilmiştir. TRAIL için de aynı durum söz konusudur; hücre zarına bağlı TRAIL hem TRAIL-R1, hem de TRAIL-R2'yi etkin bir şekilde aktive ederken, çözünebilir protein söz konusu olduğunda TRAIL-R2'nin uyarımında etkinlik kaybı söz konusu olmaktadır [103-105]. Bu nedenle, vücut tarafından kansere karşı verilen tepkide, çözünebilir ligandlardan ziyade membran-bağlı ligandlar daha büyük önem arz etmektedir.

Kanser hücrelerinin ölümcül ligandlara vereceği cevabı belirleyen önemli parametrelerden biri bu hücrelerin yüzeyindeki ölümcül ligand ve reseptör profilleridir [106]. Gen Tedavi Üitemiz tarafından yayınlanmış olan birçok çalışmada, ölümcül reseptör ve ligand profillerinin kanser prognozu ile ilişkilendirilebileceğine dair veriler elde edilmiştir. 2007 yılında yayınladığımız bir çalışma, TRAIL ve TRAIL reseptör profillerinin invaziv duktal meme karsinomlu bireylerde tümör derecesi hakkında bilgi verebildiğini göstermiştir [107]. Yine grubumuz tarafından, TRAIL ligand ve reseptör profillemenin, pankreatik duktal adenokarsinomlu dokuların sağlıklı dokulardan [108]; prostat kanserinin ise iyi huylu prostat hiperplazisinden ayrımında kullanılabileceği belirlenmiştir [109]. Bu reseptör ve ligand profillemeye yöntemi, aynı zamanda prostat kanserli bireylerde hastalık prognozu ve hastaların sağ kalım süreleri ile ilgili ön bilgi verebilmektedir [110]. Elde etmiş olduğumuz bu veriler, TRAIL ligand ve reseptör profillerinin, sağlıklı dokular ile tümör dokularının ayrımında, kanser prognozunun ve hasta sağ kalımının erken evrede belirlenmesinde kullanılabileceğine işaret etmektedir.

Grubumuz tarafından solid tümörlerde elde edilmiş olan verilere ek olarak, diğer gruplar tarafından hematolojik kanserler üzerinde yapılan bazı çalışmalarda ise, AML blastlarında CD95 (Fas) ekspresyonunun [111], diffüz büyük B-hücre lenfomasında (DLBCL) ise Fas ve FasL sentez seviyelerinin [112] sağ kalım süresiyle doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, KML blastlarında yüksek FasL [113] ve DLBCL hastalarında düşük DR5 [114] ekspresyonlarının kötü prognoza işaret ettiği de bilinmektedir. Dolayısıyla, ölüm ligand ve reseptörler profilleri, solid tümörlerin yanı sıra, hematolojik malignansilerde de hastalık seyrinin takibinde kullanılabilecek önemli bir parametredir.

Kanser dokularındaki ölümcül ligand ve reseptör sentez profilleri ile kanser prognozu arasındaki bağlantı bilinmesine rağmen, kanser hücrelerinin öldürülmesinden sorumlu bağışıklık sistem hücrelerinin ölümcül ligand sentez miktarının prognostik bir öneminin olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Hâlbuki ölümcül ligandların *in vivo* anti-tümör etkinliği, bu sitokinlerin en önemli kaynağı olan T ve NK lenfositlerine bağlıdır. T ve NK lenfositlerinin fonksiyonunun MM prognozu ile ilişkili olabileceğine dair veriler göz önüne alındığında, bu hücrelerin yüzeyindeki ölümcül ligand profillerinin araştırılması, MM prognoz takibine katkı sağlayabilir. Bu nedenle biz de çalışmamızda öncelikle bağışıklık sisteminin sitotoksik lenfositlerinde FasL ve TRAIL ekspresyon profillerinin MM hastaları ve sağlıklı bireyler arasında farklılık gösterip göstermediğini belirlemeyi hedefledik.



Şekil 2.3. Ölümçül Ligand Reseptörleri

TNF reseptörlerinden biri olan TNFR1 sitoplazmik bölgesinde bulunan ölüm bölgesi sayesinde apoptotik sinyal oluşturabilirken, TNFR2 hücre proliferasyonunu arttıran NF-kappaB yolağını uyararak anti-apoptotik etki sağlar. Fas (CD95) FasL tarafından uyarılan ana reseptördür ve hücre içi apoptotik yolları uyarır. FasL'nin bağlanabileceği bir diğer reseptör ise apoptoz yolağını uyandıramayan DcR3'dür. TRAIL'i tanıyan 5 reseptörden üçü yalancı reseptörler, ikisi ise ölüm reseptörleridir. Ekstraselüler bölgeleri Fas ile yüksek homoloji gösteren DR4 ve DR5 ölüm reseptörleri sitoplazmik bölgelerinde bulunan ölüm bölgesi (DD, kırmızı) sayesinde hücre içi apoptotik sinyalleri uyarırlar. Yalancı TRAIL reseptörlerinden DcR2, güdük DD nedeniyle apoptotik sinyal oluşturamazken DcR1'de DD yoktur ve bu reseptör transmembran değil, membran-kenetli yapıdadır. Bir diğer yalancı TRAIL reseptörü osteoprotegerin (OPG) çözünür yapıdadır ve TRAIL'e afinitesi oldukça düşüktür. Şekil uyarlanarak çizilmiştir [86, 115].

GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hasta Örneklerinin Elde Edilmesi:

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı'nda veya Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Hematoloji Bölümü'nde Multiple Myeloma (MM) tanısını yeni almış ve henüz hiçbir tedavi görmemiş hastalardan periferik kan örnekleri heparinize (yeşil kapaklı) tüplere alındı. Hastalara MM tanısı konurken göz önüne alınan parametreler, kemik iliğinde %10'dan yüksek oranda plazma hücrelerinin gözlenmesi, serum elektroforezde monoklonal bant saptanması, normal değerlerin üzerinde beta-2-mikroglobulin seviyesi ve CRAB (Hiperkalsemi, Böbrek Yetmezliği, Anemi, Litik Kemik Hastalığı) semptomlarının mevcut olmasıdır. MM dışında herhangi bir başka malinitesi olan, otoimmün hastalığı ya da tip 2 diyabeti olan ve koroner arter hastalığı (yahut myokard enfarktüs geçmişi) olan hastalar araştırma dışında tutuldu.

3.2. Kontrol Grubu Örneklerinin Elde Edilmesi:

Kontrol grubu bireyler, hasta grubu ile yaş ve cinsiyet eşleştirmeli olarak seçildi. Kontrol grubu sağlıklı bireylerin tip 2 diyabet hastası olmaması, koroner arter hastalığının bulunmaması, herhangi bir şeye alerjisinin olmaması, otoimmün hastalığının bulunmaması, statinler de dâhil olmak üzere herhangi bir ilaç kullanmıyor olması şartları arandı. Hastalar gibi, kontrol grubu bireylerin de periferik kan örnekleri, heparinize tüplere (BD) alındıktan sonra boyama işlemleri gerçekleştirildi.

Deneyimize dâhil edilmiş olan hasta/kontrol dağılımı **Tablo 3.1**'de verilmiştir.

Tablo 3.4: Çalışmaya Dahil Edilen Hasta ve Kontrol Profilleri

	Hasta		Kontrol	
Cinsiyet	Erkek	Kadın	Erkek	Kadın
Sayı	7	7	5	4
Yaş Ortalaması	55,14	67	55,8	67,2

3.3. Akış Sitometrisi

Akış sitometri analizi, BD FACScanto II cihazında FACS Diva yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Hücre popülasyonları CD3+, CD3-, CD3+CD4+, CD3+CD4+CD25+, CD3+CD8+ hücreler ve total lenfositler olarak değerlendirildi. Popülasyonlar ayrılırken izotip kontrollerden faydalanıldı.

3.3.1. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması:

1X lizis tamponu: 10X lizis tamponu (Becton Dickinson) 1:10 oranına steril distile su ile karıştırılarak hazırlandı:

%1'lik Paraformaldehit Çözeltisi: 0,1g PFA (Sigma Aldrich) tartılıp 10ml PBS içerisinde karıştırılarak çözündürüldü.

Hücre Yıkama Tamponu: Becton Dickinson firmasından hazır olarak satın alınan “Cell Wash” solüsyonu kullanıldı.

QuantiBrite PE Boncuklar: QuantiBrite PE (Becton Dickinson) boncukları içeren tüpler, 500µL Cell Wash solüsyonu eklenerek vorteksleme yöntemi ile çözündürüldü.

3.3.2. Akış Sitometri Analizi için Boyama Protokolü:

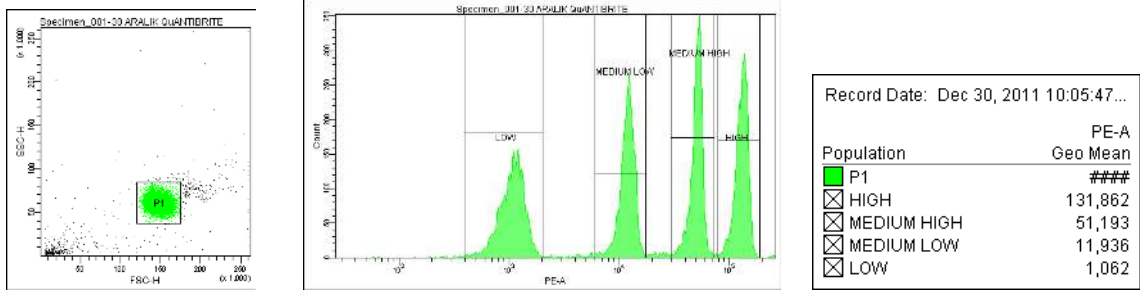
Her bir örnek için FasL, TRAIL, CD107a ve İzotip Kontrol olmak üzere dörder tüp hazırlandı. Her bir tüpe 100µL periferik kan örneği alındı. FasL, TRAIL ve CD107a tüplerine 18µL CD3-FITC, 4,5 µL CD4-APC-Cy7, 18 µL CD8-PerCP, 4,5 µL CD25-PE-Cy7, 18 µL CD56 APC antikorları eklendi. Sonrasında FasL tüpüne 4,5 µL FasL-PE, TRAIL tüpüne 4,5 µL TRAIL-PE, CD107a tüpüne ise 18 µL CD107a-PE antikorları ilave edildi. İzotip kontrol tüpü, 18 µL FITC, 4,5 µL APC-Cy7, 18 µL PerCP, 4,5 µL PE-Cy7, 18 µL APC ve 4,5 µL PE izotip kontrolleri ile muamele edildi.

Tüpler oda sıcaklığı ve karanlık ortamda 20 dakika bekletildi. 20 dakika sonrasında tüpler 100 µL 1X lizis tamponu ile homojenize edilerek tekrar karanlık ortam ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Bekleme sürecinin ardından tüpler 3500 rpm hızdaki santrifüjde 5 dakika çevrildi. Dökelti atılarak çökelti 1000 µL Cell Wash solüsyonu içerisinde çözündürüldü ve tekrar 3500 rpm hızda 5 dakika santrifügasyon yapıldı. Dökelti tekrar atılarak Cell Wash solüsyonu ile yıkama aşaması tekrar edildi. Ardından elde edilen çökelti, 600 µL Cell Wash içerisinde çözündürülerek analize hazır hale getirildi. Gerekli görüldüğü durumlarda (eğer akış sitometri analizi gün içerisinde gerçekleştirilemeyecekse) 600 µL %1 PFA eklenerek örnekler +4°C karanlık ortamda saklandı.

3.3.3. Akış Sitometri Analiz Protokolü:

Akış sitometri analizine başlanmadan önce, tezimizde kullandığımız florofor renklerinden yanlış sinyal gelmemesi için kompanzasyon işlemi gerçekleştirildi. Kompanzasyon işlemi, öncelikle BD FACScanto II cihazı için üretilmiş olan boncuk kitiyle, ardından elimizdeki boyalara özel manüel düzenlemelerle gerçekleştirildi.

Her analiz öncesinde, QuantiBrite PE tüpü okutularak boncuklara FSC-H/SSC-H grafiğinden kapı açıldı ve PE sinyalleri histogram olarak değerlendirildi. Gözlenen 4 ayrı popülasyon sinyal yoğunluklarına göre Düşük (Low), Orta-Düşük (Med-Low), Orta-Yüksek (Med-High) ve Yüksek (High) olarak sınıflandırıldı. Bu popülasyonların sinyal değerlerinin geometrik ortalaması FacsDiva yazılımının istatistik programı vasıtasıyla belirlendi.



Şekil 3.1. QuantıBrite Boncuklar Okutulduktan Sonra İzlenen Protokol:

QuantıBrite Boncuklar FSC-H/SSC-H ekseninde okutulduktan sonra boncuk kapısı açılır. Elde edilen sinyaller PE ekseninde okutulduğunda 4 tepe oluştuğu gözlemlenir. Bu tepeler, Düşük (Low), Orta-Düşük (MediumLow), Orta-Yüksek (MediumHigh) ve Yüksek (High) olarak gruplandırılır. Bu tepelerden alınan floresan sinyallerin geometrik ortalamaları, yukarıda anlatılmış şekilde olduğu gibi Excel tablosuna girilir ve regresyon eğrisi çıkarılır.

FacsDiva yazılımı kullanılarak, FSC/SSC ekseninden öncelikle lenfosit popülasyonu kapısı açıldı. Bu hücrelerin PE sinyalleri Total Lenfosit PE sinyali olarak değerlendirildi. Lenfosit kapısından CD3+ hücreler (T hücreleri) ve CD3- hücreler (T hücreleri dışındaki lenfositler) belirlendi. CD3+ hücrelere de bir kapı açılarak bu hücreler de CD3+ CD4+ (yardımcı T hücreleri (Th)) ve CD3+ CD8+ (Sitotoksik T lenfositleri (CTL)) hücreler olarak ayrıldı. CD3+ CD4+ hücre kapısından da CD25+ ve CD25- hücre popülasyonları ayırt edildi. Bu hücre gruplarındaki PE sinyal dağılımları histogram analizi ile çıkarıldı ve geometrik ortalama değerleri elde edildi.

3.3.4. Sinyal Değerlerinin Analizi ve İstatistiksel Değerlendirme:

QuantıBrite PE boncuklar okutulduğunda elde edilen geometrik ortalama değerleri (FL2) Excel dosyasına girilerek bunların Log10 üzerinden değerleri hesaplandı. QuantıBrite PE tüpleri ile beraber gelen PE/Boncuk değerleri de yine aynı Excel dosyasında Log10 üzerinden hesaplandı. PE/Boncuk Log10 değerleri y eksen, FL2 Log10 değerleri x eksen kabul edilerek regresyon grafiği çıkarıldı. Grafik üzerinde lineer regresyon korelasyon sabiti ve regresyon denklemi çıkarıldı. Bu denklem örneklerden elde edilen PE sinyallerinin hücre başına düşen antikor şeklinde değerlendirilmesinde kullanıldı. Bunun için de, yine hücre popülasyonlarından elde edilen sinyallerin geometrik ortalamaları Log10 üzerinden hesaplandı. Log10 değerleri X eksen kabul edilerek hücre başına düşen antikor (APC değerleri) hesaplandı. Nicel APC değerlerinin yanı sıra, PE+ hücre popülasyonlarının ortalama floresan yoğunlukları (MFI) FlowJo programı kullanılarak hesaplandı. Aynı yazılım ile hücre popülasyonlarının ayrımı FACS Diva yazılımı için tarif edildiği şekilde tekrar edildi ve doğrulandı. PE sinyal değerleri, hem pozitif hem de negatif hücrelerin PE sinyal geometrik ortalamaları ve yine MFI değerleri göz önüne alınarak değerlendirildi. Bu verilerin yanı sıra aynı yazılım kullanılarak pozitif hücrelerin ortalama floresan yoğunlukları (MFI) hesaplandı ve izotip/deney PE sinyal histogram grafikleri hazırlandı.

3.3.4. İstatistiksel Analiz ve Verilerin Hazırlanması

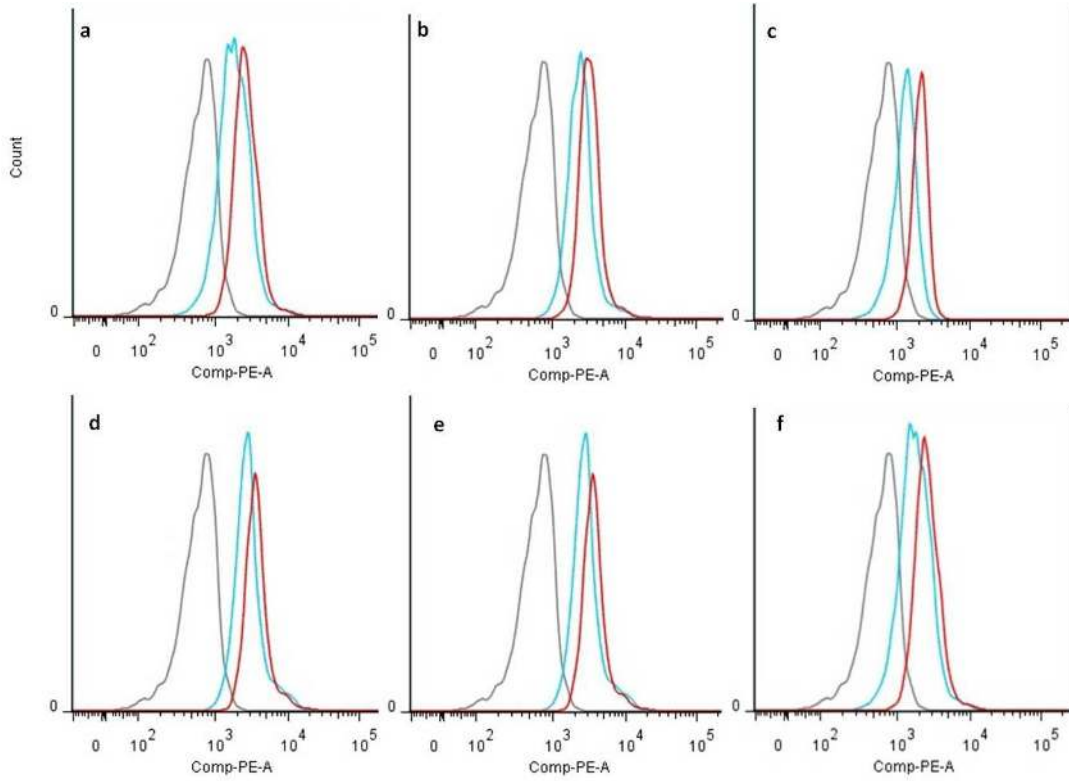
Kontrol grubu bireylerin ve deney grubunun lenfosit popülasyonlarındaki ABC ve MFI değerleri, SPSS istatistik programı kullanılarak karşılaştırıldı. Değerlerin

normal dağılıma uymaması nedeniyle non-parametrik test olan Mann-Whitney U testinden faydalanıldı. İstatistiksel anlamlılık derecesi $p<0,05$ olarak kabul edildi. Bağlantı (korelasyon) testlerinde ise Spearman Rho testi kullanıldı. Noktasal dağılım grafikleri Graphpad programı ile, kutu grafik çizimleri ise SPSS programı ile gerçekleştirildi.

BULGULAR

4.1. FasL ve TRAIL proteinlerinin lenfositler yüzeyindeki ekspresyonu akış sitometrisi ile gösterilebilmektedir.

MM hastaları ve sağlıklı bireylerin lenfosit popülasyonları arasında yüzey FasL ve TRAIL ekspresyonları bakımından farklılık olabileceğine dair hipotezimizi akış sitometri yöntemi ile test ettik. Literatürde bulunan bilgiler, NK hücreleri ve T lenfositlerinde FasL ve TRAIL ekspresyonunun sitokin uyarımı sonrasında artış gösterdiği, fakat dinlenme konumundaki ekspresyonun akış sitometri yöntemi ile gösterilemeyecek kadar düşük olduğuna yönelikti [116-118]. Biz ise yaptığımız deneyler sonrasında sağlıklı bireylere ait lenfositlerin yüzeyinde FasL ve TRAIL ekspresyonunun lenfosit izolasyonu yapılmaksızın tam kan boyaması yapıldığı takdirde akış sitometri ile gösterilebildiğini belirledik. Elde ettiğimiz verilere göre, hem FasL, hem de TRAIL antikorlarından alınan PE sinyal değerleri, aynı renk floroforla işaretli izotip kontrollere göre belirgin bir farklılık göstermektedir (Şekil 1).



Şekil 4.1: FasL ve TRAIL yüzey ekspresyonları akış sitometri yöntemi ile gösterilebilmektedir.

52 yaşındaki kadın kontrole ait lenfositlerin yüzey FasL (mavi) ve TRAIL (kırmızı) sentez profilleri izotip kontroller (gri) referans alınarak solda gösterilmiştir. a) CD3+; b) CD3+CD4+; c) CD3+CD8+; d) CD3+CD4+CD25+; e) CD3-; f) Bütün lenfositler. Sinyal/hücre sayısı dağılımını gösteren histogramlar, FlowJo yazılımı kullanılarak analiz edilmiş ve çalıştırılmıştır.

4.2. Multiple Myeloma Hastalarına Ait Periferik Kan Lenfositlerindeki TRAIL ve FasL Ekspresyonu Sağlıklı Kontrollere Nazaran Düşük Gözlenmiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre hem MM hastalarına, hem de

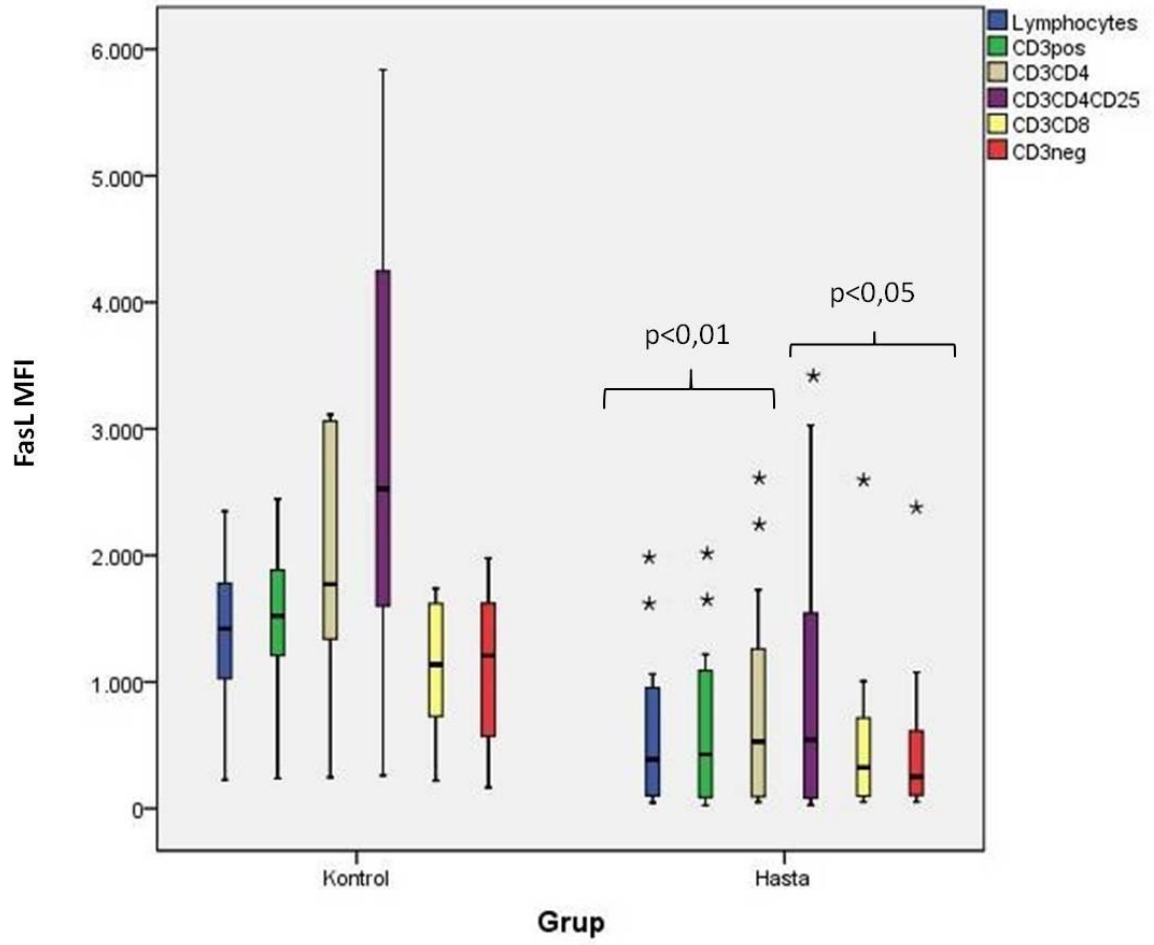
yaş/cinsiyet eşleştirmeli sağlıklı kontrollere ait lenfositlerinin yüzeyinde FasL ve TRAIL proteinleri sentezlenmektedir. Sağlıklı kontroller ve MM hastalarının FasL/TRAIL ekspresyon seviyelerindeki farklılıkların belirlenmesi için ortalama floresan intensiteleri (MFI değerleri) değerlendirildi. Öncelikli olarak akış sitometri analizi esnasında boyut/granülerite değerlerine bakılarak lenfosit kapısı açıldı. Bunun ardından CD3+ ve CD3- hücreler ayrı ayrı belirlendi. CD3+ hücre kapısından ise CD8+, CD4+ ve CD4+CD25+ hücreler saptandı. Her bir hücre popülasyonunda FasL+/FasL- veya TRAIL+/TRAIL- ayrımı yapılmaksızın bütün hücrelerin verdiği ortalama PE floresan sinyal değerleri incelendi.

4.2.1. MM hastaları ve Sağlıklı Kontrollere Ait Lenfositlerdeki FasL Ekspresyon Profillerinin Değerlendirilmesi.

14 hasta ve 9 sağlıklı kontrole ait T lenfosit popülasyonlarının verdikleri FasL sinyali (MFI değerleri) FlowJo programı ile saptanıp SPSS istatistik yazılımı ile değerlendirildi (**Şekil 2**). Elde ettiğimiz verilere göre, incelemiş olduğumuz bütün lenfosit gruplarının yüzeyindeki FasL ekspresyon oranları MM hastalarında sağlıklı kontrollere nazaran daha düşüktür. Bütün lenfositler, CD3+ T hücreleri ve CD3+CD4+ yardımcı T hücreleri incelendiğinde sağlıklı grup ve hasta grubu arasındaki farkın oldukça belirgin olduğu saptandı ($p<0,01$). Benzer bir şekilde, CD3+CD8+ sitotoksik T hücreleri, CD3- lenfositler ve CD3+CD4+CD25+ hücrelerde de istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu belirlendi ($p<0,05$). CD3+ hücreler incelenirken CD3+CD8+ sitotoksik T hücreleri (CTL), CD3+CD4+ yardımcı T hücreler (Th) ve CD4+CD25+ T hücreleri ayrı ayrı değerlendirildi (**Şekil 3**). Kontrol grubu bireylere ait lenfositlerden ve MM hastalarının lenfositlerinden alınan sinyallerin ortanca değerleri **Tablo 5**'de verilmiştir.

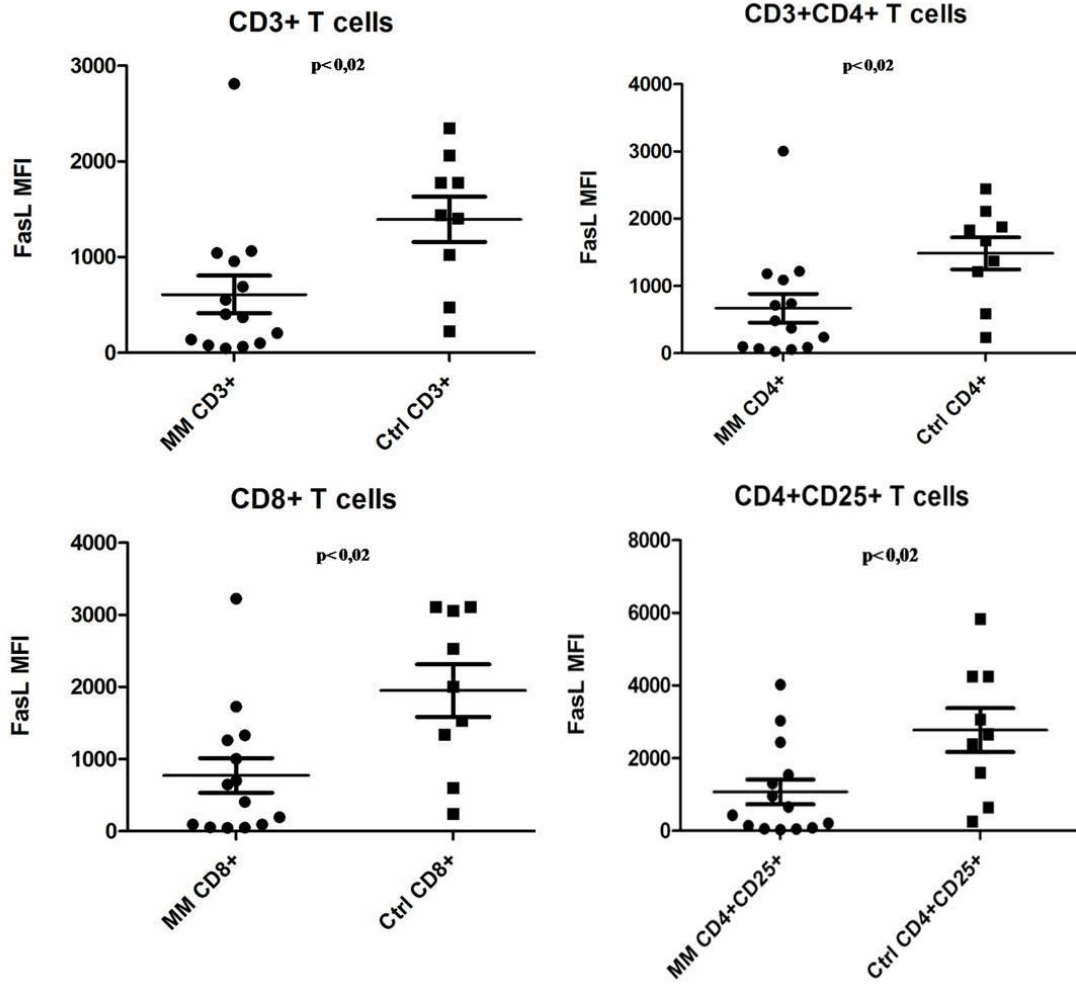
Tablo 4.5. FasL MFI Ortanca Değerleri

	Hasta FasL MFI Ortanca Değerleri	Kontrol FasL MFI Ortanca Değerleri
Lenfositler	387	1422
CD3+	427	1523
CD3+CD4+	528	1772
CD3+CD8+	325	1136,5
CD3+CD4+CD25+	543,5	2526
CD3-	251	1208



Şekil 4.2: Kontrol grubu ve hasta grubuna ait lenfosit popülasyonlarının FasL ekspresyon oranları arasında belirgin farklılık gözlenmiştir.

İstatistiksel analiz ve kutu-grafigi SPSS yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İncelenen bütün lenfosit popülasyonlarında MM hastalarının sağlıklı kontrollere nazaran daha düşük FasL sinyali verdiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.3: CD3+ hücre popülasyonlarındaki FasL ekspresyonları.

CD3+ T hücre popülasyonları kendi içerisinde ayrılarak yapılan istatistiksel analiz sonucunda, yardımcı T hücrelerinde (Th, CD4+) ($p < 0,01$), sitotoksik T hücrelerinde (CTL, CD8+) ($p < 0,05$) ve CD4+CD25+ hücrelerde ($p < 0,05$) MFI değerlerinin MM hastalarında sağlıklı bireylere nazaran azalmış olduğu tespit edilmiştir.

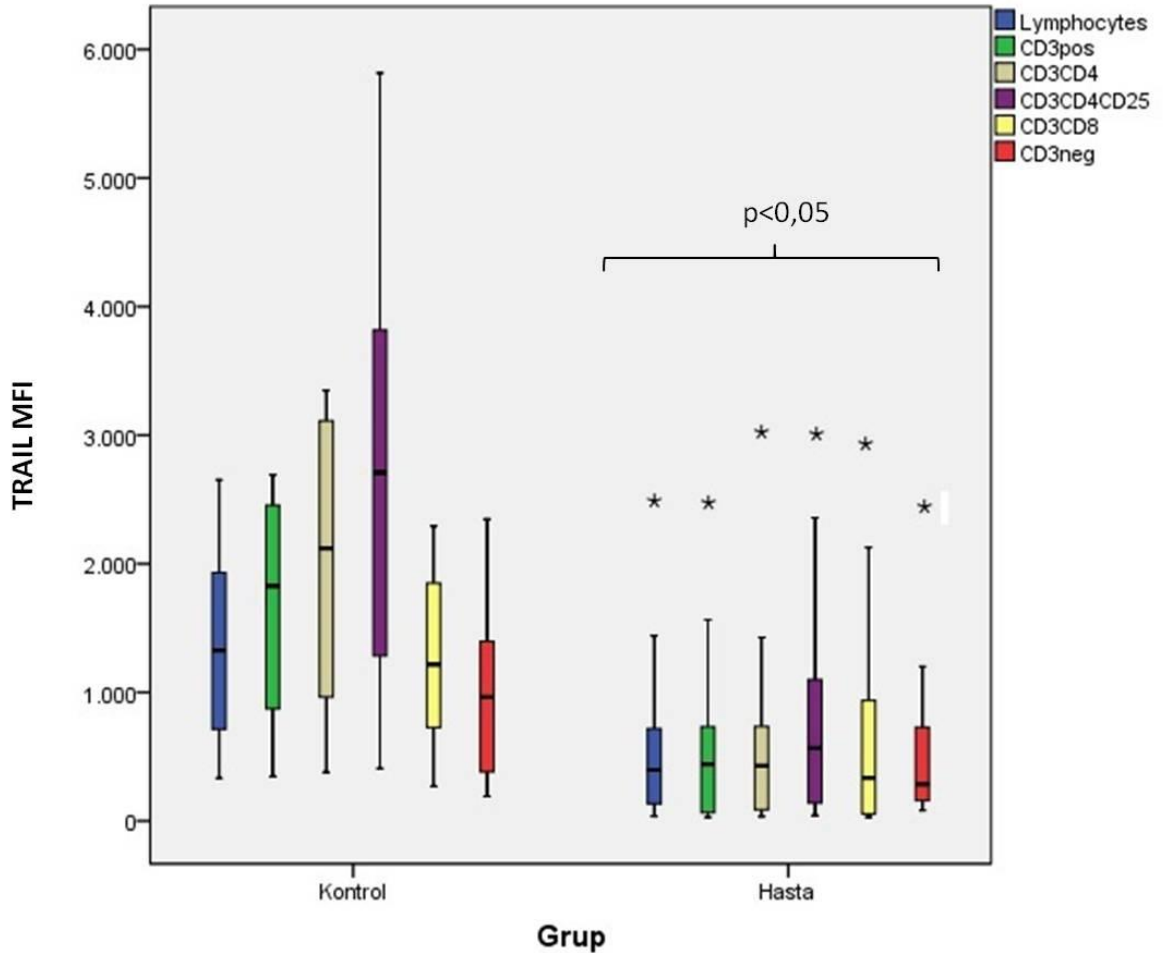
4.2.2. MM hastaları ve Sağlıklı Kontrollere Ait Lenfositlerdeki TRAIL Ekspresyon Profillerinin Değerlendirilmesi.

FasL sinyallerini analiz etmekte kullanılan metotlar tekrar edilerek TRAIL sinyalleri de analiz edildi. Elimizde bulunan verilere göre, FasL gibi TRAIL ortalama sinyal profilleri de sağlıklı bireyler ve MM hastalarına ait lenfosit gruplarında anlamlı bir farklılık göstermektedir ($p < 0,05$). Lenfosit popülasyonlarının hasta grubu ve kontrol grubu olarak ayrılarak TRAIL ortalama sinyal yoğunluklarının değerlendirildiği kutu grafiği **Şekil 4**'de gösterilmiştir. Ayrıca, FasL ortalama sinyalleri analiz edilirken olduğu gibi, TRAIL sinyalleri de T hücre popülasyonları göz önüne alınarak belirlendi

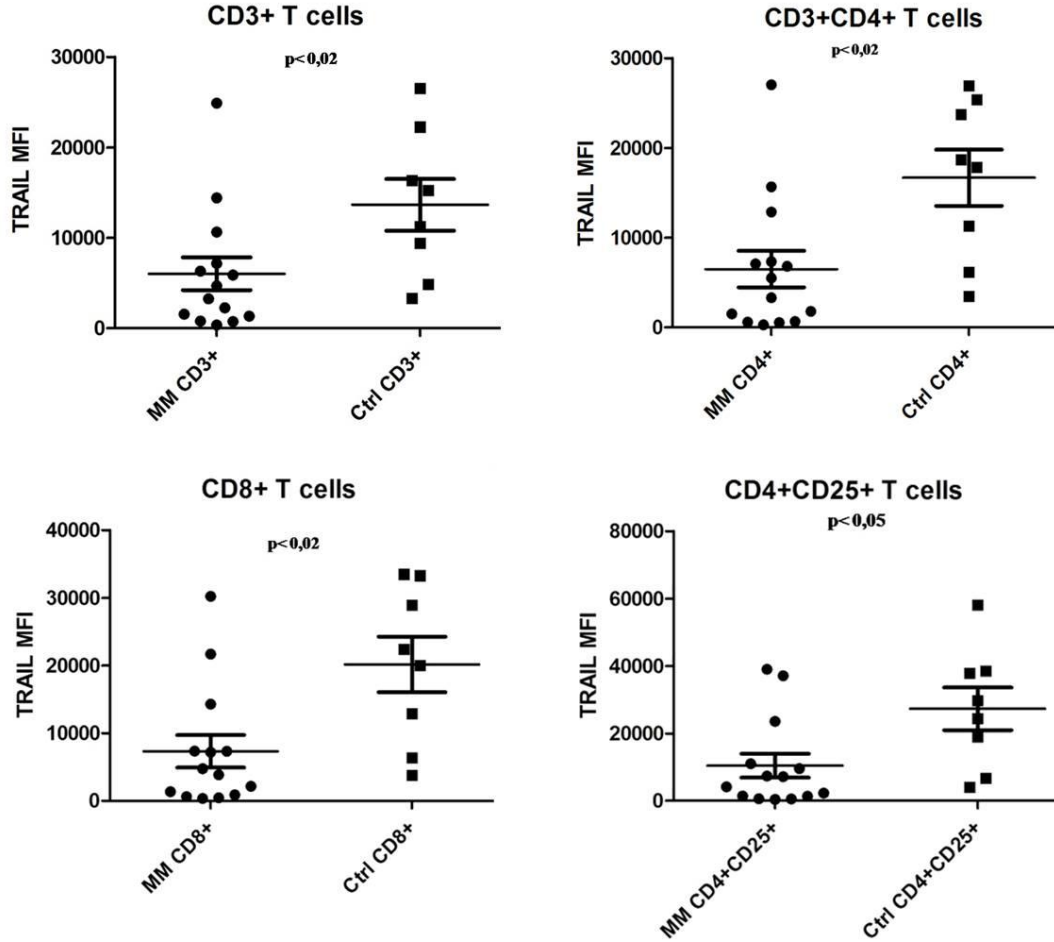
(Şekil 5). Lenfositlerin verdiği TRAIL sinyal yoğunluklarının ortalanca değerleri **Tablo 6**'da verilmiştir.

Tablo 4.6. TRAIL MFI Ortanca Değerleri

	Hasta FasL MFI Ortanca Değerleri	Kontrol FasL MFI Ortanca Değerleri
Lenfositler	387	1422
CD3+	427	1523
CD3+CD4+	528	1772
CD3+CD8+	325	1136,5
CD3+CD4+CD25+	543,5	2526
CD3-	251	1208



Şekil 4.4: Kontrol grubu ve hasta grubuna ait lenfosit popülasyonlarının ortalama TRAIL ekspresyonları arasında belirgin farklılık gözlenmiştir. İstatistiksel analiz ve kutu-grafiği SPSS yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İncelenen bütün lenfosit popülasyonlarında MM hastalarının sağlıklı kontrollere nazaran daha düşük TRAIL sinyali verdiği ($p<0,05$) tespit edilmiştir



Şekil 4.5. CD3+ hücre popülasyonlarındaki TRAIL ekspresyonları.

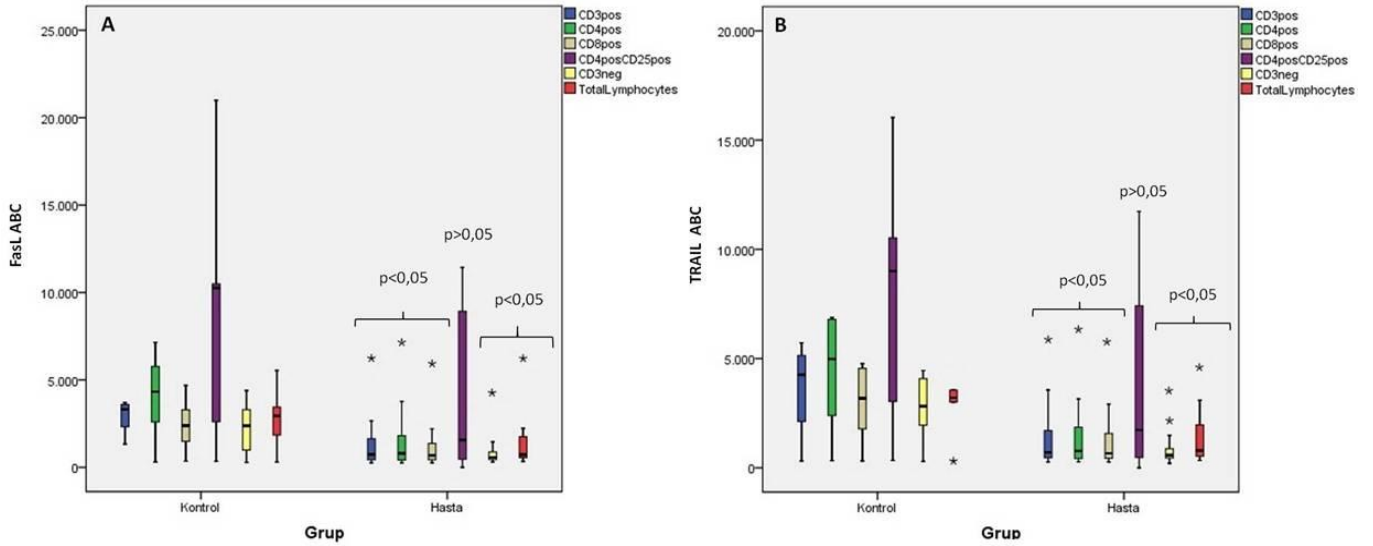
CD3+ T hücre popülasyonları kendi içerisinde ayrılarak yapılan istatistiksel analiz sonucunda, yardımcı T hücrelerinde (Th, CD4+) ($p<0.01$), sitotoksik T hücrelerinde (CTL, CD8+) ($p<0.05$) ve CD4+CD25+ hücrelerde ($p<0.05$) TRAIL MFI değerlerinin MM hastalarında sağlıklı bireylere nazaran azalmış olduğu tespit edilmiştir.

4.3. MM Hastaları ve Sağlıklı Kontrollerin Lenfositlerindeki Hücre Başına Düşen Ölümcül Ligand Sayısı Kantitatif Olarak Değerlendirildiğinde Farklılık Belirlenmiştir.

Akış sitometri çalışmalarında genel olarak kullanılan yöntem ortalama sinyal intensitelerinin (MFI) değerlendirilmesi olsa da, hücre başına düşen ligand sayısının hücresel ekspresyon regülasyonu hakkında daha gerçekçi bilgi verebileceğini düşündük. Bu nedenle çalışmamızda MFI değerlerinin yanı sıra hücre başına düşen antikor miktarının (ABC değerlerinin) hesaplanmasına da yer verildi. ABC değerinin tespiti ile hücrelerde ekspresyonu gözlenen ortalama ligand sayısı belirlenebilmektedir.

4.3.1. MM hastaları ve Sağlıklı Kontrollere Ait Lenfositlerin Yüzeyinde Sentezlenen FasL ve TRAIL Protein Sayılarının Değerlendirilmesi

Lenfositler üzerindeki FasL ve TRAIL proteinlerinin kantitatif analizi QuantiBrite PE boncuklar kullanılarak gerçekleştirildi (bkz. 3.3.4). Bu hesaplamalar için PE sinyallerinin geometrik ortalamaları örneklerin akış sitometri analizi esnasında FACSDiva yazılımının istatistik programı kullanılarak hesaplandı. Nispeten daha nesnel bir değerlendirme olan bu yöntem uygulandığında elde edilen sonuç MFI değerlerine benzer olsa da, CD4+CD25+ T hücrelerinin istisnai bir durum teşkil ettiğini saptadık. Elde ettiğimiz verilere göre, MM hastalarında incelenen bütün lenfositlerde hücre yüzeyindeki FasL ve TRAIL protein sayıları azalmış olsa da, bu azalış CD4+CD25+ hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı oranda değildir (Şekil 6). **Tablo 7**'de FasL ABC ortanca değerleri, **Tablo 8**'de ise TRAIL ABC ortanca değerleri verilmiştir.



Şekil 4.6. Kontrol grubu ve hasta grubuna ait lenfositler, hücre başına düşen FasL ve TRAIL antikor sayısına göre değerlendirildiğinde farklı ekspresyon profilleri gözlemlendi.

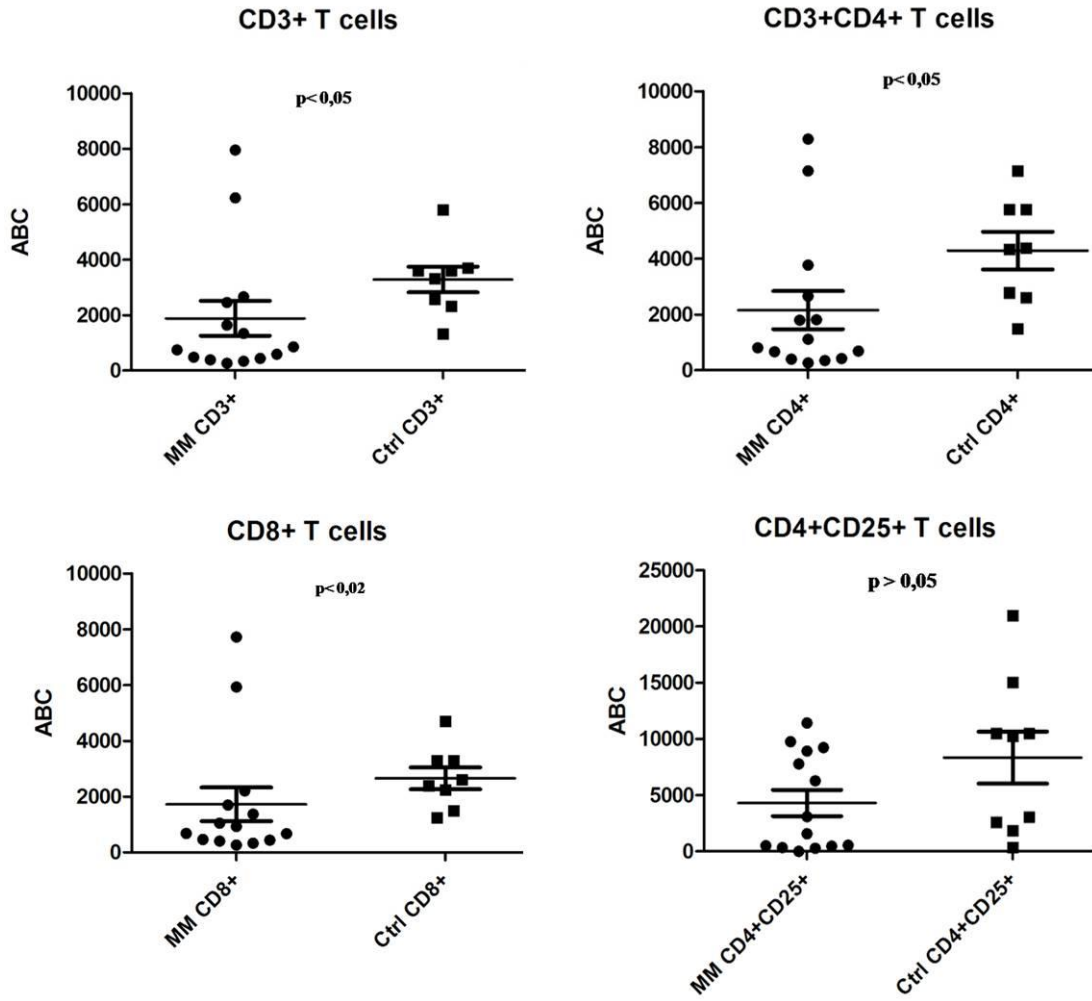
MM hastalarına ve sağlıklı bireylere ait lenfosit popülasyonlarının hesaplanan ABC değerleri karşılaştırıldığında CD3+CD4+CD25+ lenfositler dışındaki ($p > .05$) bütün lenfositlerin yüzey FasL (A) ve TRAIL (B) sayısının MM hastalarında daha düşük olduğu belirlenmiştir ($p < .05$). İstatistiksel analiz ve kutu-grafiği SPSS yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.7. Hasta ve Kontrol Gruplarına Ait Lenfositlerde Bulunan Ortalama FasL Protein Miktarları

	Hasta FasL ABC Ortanca Değerleri	Kontrol FasL ABC Ortanca Değerleri
Lenfositler	958	3067
CD3+	797	3455
CD3+CD4+	959,5	4354
CD3+CD8+	806	2496
CD3+CD4+CD25+	2339	10371
CD3-	2450	576

Tablo 4.8. Hasta ve Kontrol Gruplarına Ait Lenfositlerde Bulunan Ortalama TRAIL Protein Miktarları

	Hasta TRAIL ABC Ortanca Değerleri	Kontrol FasL ABC Ortanca Değerleri
Lenfositler	794	3208
CD3+	705	4261
CD3+CD4+	773	4978
CD3+CD8+	665	3180
CD3+CD4+CD25+	1731	9003
CD3-	580	2816



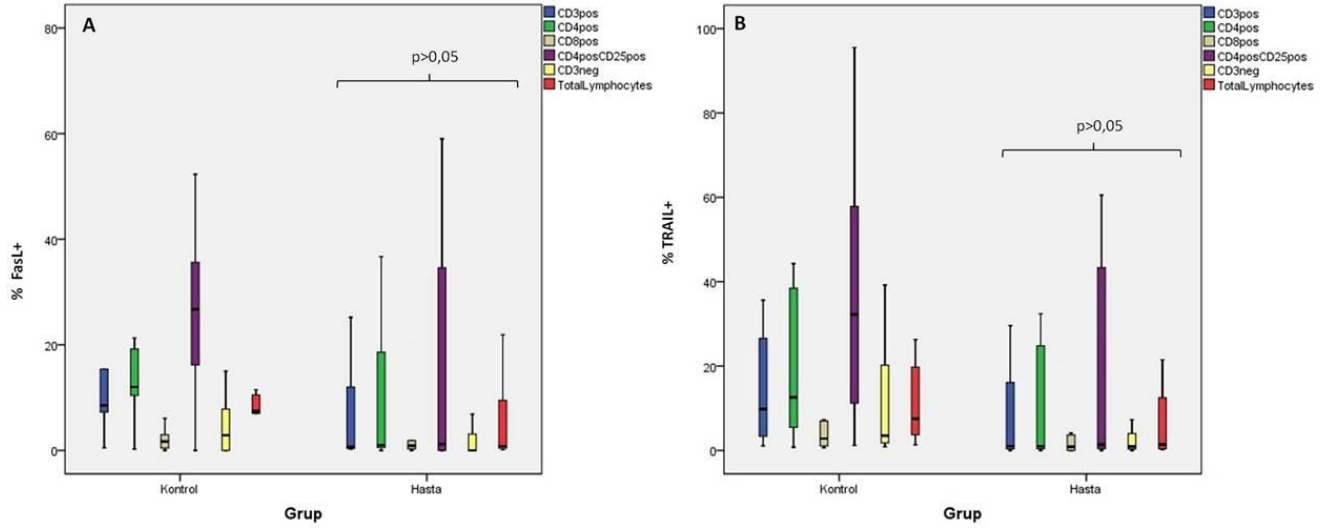
Şekil 4.7. CD3+ hücre popülasyonlarındaki FasL ABC değerleri

CD3+ T hücre popülasyonları kendi içerisinde ayrılarak yapılan istatistiksel analiz sonucunda, yardımcı T hücrelerinde (Th, CD4+) ($p < 0,05$), sitotoksik T hücrelerinde (CTL, CD8+) ($p < 0,02$) hücre başına düşen antikör miktarlarının değiştiği, CD4+CD25+ hücrelerde ise ekspresyondaki düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p > 0,05$) saptanmıştır.

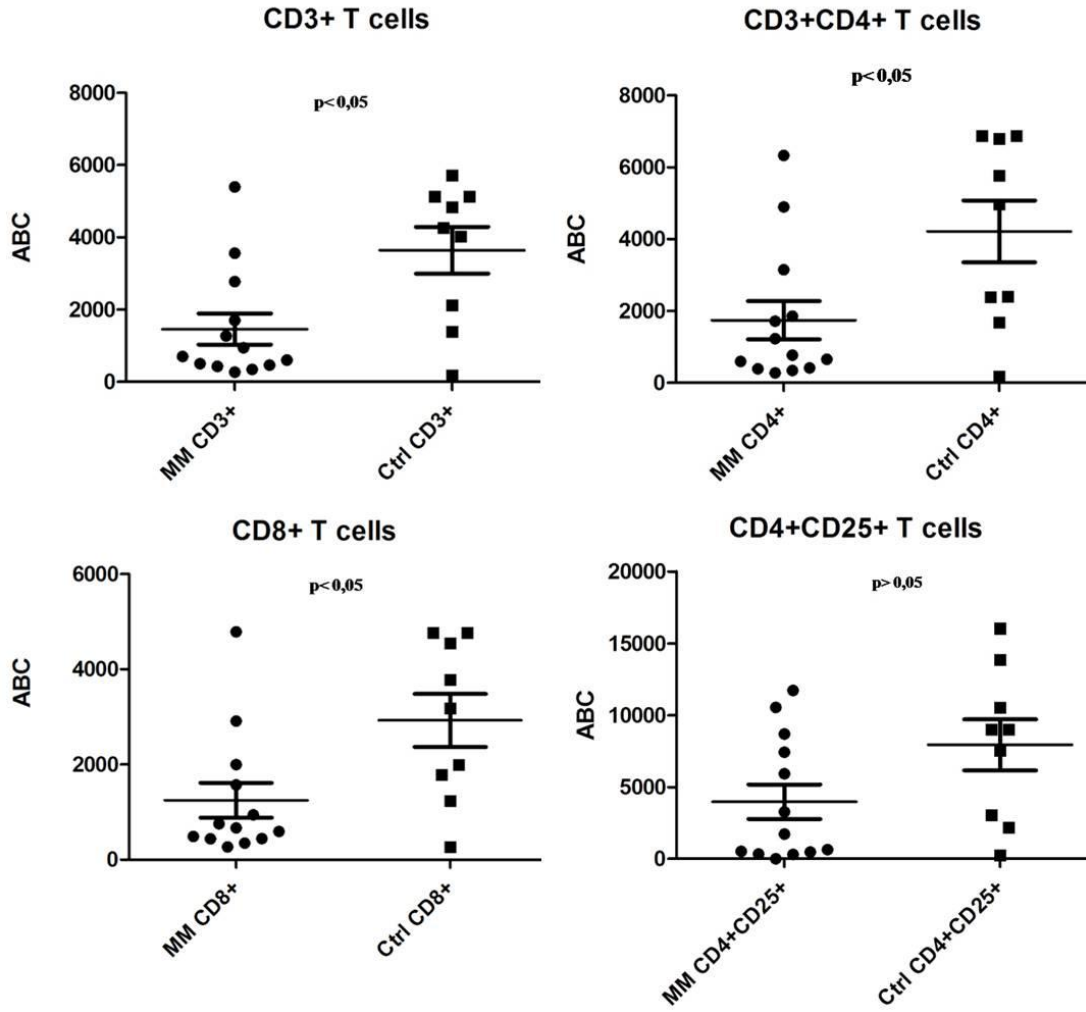
4.4. MM Hastaları ve Sağlıklı Kontrollerin Ölümcül Ligand Sentezleyen Lenfosit Oranları Arasında Anlamlı Bir Farklılık Gözlenmedi.

Çalışmamızda, MM hastalarına ait lenfositlerin yüzeyindeki FasL ve TRAIL ekspresyonunun sağlıklı bireylere kıyasla düşmüş olduğunu belirledik. Lenfositlerin ölümcül ligand aracılı apoptotik etkisi üzerindeki en önemli rol hücre başına düşen ligand sayısı olsa da, bu proteinleri eksprese eden hücrelerin sayısı da önem arz edebilir. Bu nedenle, akış sitometri verileri aynı zamanda FasL ve TRAIL eksprese eden hücre oranlarının MM hastaları ve sağlıklı kontroller arasında değerlendirilmesi için yorumlandı. Ligand ekspresyon eşiği, izotip kontrollere göre belirlendi. Çalışmamıza dahil edilen her bir lenfosit popülasyonu için eşik değeri üzerinde sinyal veren hücreler belirlendi ve yüzde değerleri elde edildi. FlowJo programı ile ligand pozitiflik oranları belirlenen hücre popülasyonları SPSS istatistik programı kullanılarak hasta-kontrol

grupları arasında karşılaştırıldı. Bu analizler sonrasında, MM hastaları ve sağlıklı kontroller arasında ölümcül ligand ekspresyonu gösteren hücre yüzdeleri açısından farklılık saptanmadı (Şekil 7).



Şekil 4.8. Kontrol grubu ve hasta grubuna ait lenfositlerin ölümcül ligand pozitiflik oranları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi. MM hastalarına ve sağlıklı bireylere ait lenfositlerde FasL (A) ve/veya TRAIL (B) ekspresyonu gösteren hücre oranlarında anlamlı bir farklılık söz konusu değildir ($p>.05$).



Şekil 4.9. Kontrol grubu ve hasta grubuna ait lenfositlerin ölümcül ligand pozitiflik oranları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi. MM hastalarına ve sağlıklı bireylere ait lenfositlerde FasL (A) ve/veya TRAIL (B) ekspresyonu gösteren hücre oranlarında anlamlı bir farklılık söz konusu değildir (p>.05).

4.5. Lenfositler Yüzeyindeki FasL ve TRAIL Ekspresyon Profilleri Birbiri ile Bağlantılı Bulundu.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre, MM hastalarında sağlıklı bireylere nazaran azalmış FasL ve TRAIL ekspresyonu söz konusudur. FasL ve TRAIL protein sayılarındaki azalmanın ortak bir denetim mekanizmasından geçip geçmediğini belirlemek için lenfosit grupları üzerindeki FasL ve TRAIL ekspresyon oranları korelasyon testi ile değerlendirildi. Analiz sonuçlarımıza göre, FasL ve TRAIL ekspresyon seviyeleri arasında belirgin bir bağlantı söz konusudur (**Tablo 4**); yani ligandlardan birinin ekspresyon seviyesindeki artış ya da azalış, diğerinin ekspresyon seviyesinde de aynı etkinin söz konusu olduğunu göstermektedir.

Hücre Popülasyonları	Korelasyon Sabiti	p değeri
Lenfositler	0,791	0,000
CD3+ hücreler	0,707	0,000
CD3+CD4+ hücreler	0,664	0,000
CD3+CD8+ hücreler	0,662	0,001
CD3+CD4+CD25+ hücreler	0,691	0,000
CD3- hücreler	0,624	0,000

Tablo 4.9: FasL ve TRAIL'in yüzey ekspresyonu eşzamanlıdır.

Genel lenfosit popülasyonunun, CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3+CD4+CD25+ ve CD3- lenfositlerin üzerlerindeki ligand sayıları (ABC değerleri) SpearmanRho korelasyon testi ile değerlendirildi. Analizimize göre, FasL ve TRAIL'in lenfositler üzerinde ekspresyonu eş zamanlı olup, ortak bir regülasyon mekanizması ile denetlenmektedir.

TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Multiple Myeloma, monoklonal plazma hücrelerinin kemik iliğinde birikmesi sonucu meydana gelen ve uç organ yetmezliklerine yol açan tehlikeli bir hematolojik kanser tipidir. Birçok farklı kanser tipi gibi, Multiple Myeloma hastalarının bağışıklık sistemlerinde de tümöre karşı tepki gösteren mekanizmaların bozunumu söz konusudur [74]. Bağışıklık sisteminin tümöre karşı savaş mekanizmalarından biri, ölümcül ligand aracılı apoptoz uyarımıdır. In vitro koşullarda, gerek FasL [119], gerekse TRAIL'in myeloma hücrelerini öldürebildiği bilinmektedir [120-122]. Hasta myeloma hücreleri incelendiğinde de, hem TRAIL ölüm reseptörlerinin, hem de Fas antijeninin yüzey ekspresyonu gösterilmiştir [123]. Tedavi stratejileri geliştirilmesi yönündeki çalışmalarda, TRAIL ölüm reseptörlerini hedefleyen agonistik antikörlerin MM apoptozunu sağlayabildiği belirlenmiştir [124]. Bütün bu veriler, MM hastalarının FasL/TRAIL aracılı apoptoz mekanizmalarının bozulmuş olabileceğini, bunun da MM hastalarına ait sitotoksik lenfositlerde ölümcül ligandların ekspresyonlarının azalmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle biz de çalışmamızda MM hastalarına ait sitotoksik lenfositlerin yüzeyindeki ölümcül ligand ekspresyon profillerini belirlemeyi amaçladık. Elde ettiğimiz sonuçlar, hipotezimizi doğrular şekilde, özellikle CD3+ hücre popülasyonlarının yüzeyinde FasL ve TRAIL ekspresyon profillerinin değiştiğini ve hücre yüzeyine bağlı olan ligand sayılarının azaldığını göstermektedir.

Ölümcül ligandların tümör hücrelerinin apoptozuna yol açabilmesi için, ölüm reseptörleri tarafından tanınabilmesi, yani hücre yüzeyine çıkmış olması gereklidir. Bu nedenle, ligand profillemesi, mRNA ya da hücre içi protein ekspresyonuna göre değil, hücre yüzeyinde proteinlerin varlığına göre yapılmalıdır. Bu nedenle biz de çalışmamızda hem MM hastalarından hem de sağlıklı kontrollerden alınan periferik kan örneklerini herhangi bir müdahaleye tabi tutmaksızın akış sitometri yöntemiyle analiz ettik. Bugüne kadar genel kanı, periferik kandan alınan lenfositlerin yüzeyinde ölümcül ligand ekspresyonlarının akış sitometri ile belirlenmesi için öncelikle sitokin uyarımına maruz bırakılması gerektiği yönündeydi. Literatürde mevcut yayınlarda, T ve NK lenfositlerinde hücre içi FasL ve TRAIL ekspresyonunun olduğu, fakat bu ligandların yalnızca aktivasyon sonrasında hücre yüzeyine çıkabildiği rapor edilmiştir [116-118, 125]. Özellikle perforin/granzim granüllerinin salınımının engellenmesi durumunda FasL ve TRAIL'in hücre yüzeyine çıkamaması, bu durumu desteklemektedir [126, 127]. Bu çalışmaların ortak yönlerinden biri, önce lenfositlerin izole edilip sonra akış sitometrinin yapılması, yani hücrelerin mekanik strese maruz tutulması ve ortamdaki uyarıcı faktörlerin tamamen arındırılmasıdır. Kanımızca, dışarıdan sitokin muamelesi ile lenfositlerin aktive edilmesi ve bu sayede ölümcül ligand yüzey ekspresyonunun belirlenmesi, hastaların bağışıklık sistemlerinin vücut içi aktivasyon oranını değil, aktive edilebilirlik kapasitesini analiz etmekte kullanılabilir. Hücre kültür ortamı ve vücut içi fizyolojik ortam karşılaştırıldığında, periferik kan dolaşımındaki hücrelerin sürekli "tehlike sinyali"ne maruz kaldığı, dolayısıyla zaten aktif oldukları düşünülebilir.

Bu nedenle periferik kandan alınan lenfositlerin yüzey ölümcül ligand ekspresyonu herhangi bir müdahale olmaksızın direk değerlendirilmelidir. Nitekim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, periferik kan alınır alınmaz akış sitometri boyamasına maruz tutulduğu ve sonra lizis uygulamasıyla eritrositlerden arındırıldığı takdirde ligand sinyalinin akış sitometri ile belirlenebildiğini göstermektedir.

Yüzey proteinlerinin ekspresyon profillerinin akış sitometri analizi için en sık değerlendirilen parametre ortalama sinyal yoğunlukları (MFI değerleri)'dir. Nispeten yeni bir diğer analiz metodu ise kantitatif akış sitometri (QFCM)'dir. Kantitatif analiz için kullanılmakta olan dört temel metot vardır: Qifikit, CellQuant, QuantiBrite PE ve Quantum Simply Cellular System. Biz çalışmamızda hücre başına düşen antikor sayısını (ABC) belirlemek için, QuantiBrite PE boncuklardan ve PE işaretli FasL/TRAIL antikorlarından faydalandık. Çoğu hücre popülasyonunun MFI ve ABC değerlerinin sağlıklı/hasta karşılaştırması birbiri ile tutarlı olsa da, CD3+CD4+CD25+ hücreler için durum farklı bulundu. Bu hücrelerde MFI değerleri sağlıklı ve hasta bireyler arasında bariz derecede farklı iken ABC değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. MFI, alınan ortalama sinyal değerini aritmetik ortalama ile verirken, ABC hesaplamalarında sinyal değerlerinin geometrik ortalaması kullanılır. Hücre yüzey proteinlerinin sabit değil, değişken bir alan içerisinde gidip geliyor olması; yani FasL+/TRAIL+ hücrelerin ayrı bir popülasyon oluşturmak yerine farklı sinyal değerleri ile homojen olmayan bir dağılım göstermesi; bu analiz için geometrik ortalamanın kullanılmasını daha uygun hale getirmektedir. Yani homojen dağılım göstermeyen ekspresyon profilleri incelenirken QuantiBrite boncuklar ile sayısal analizin yapılması, ortalama sinyal yoğunluklarının değerlendirilmesinden daha hassas sonuç verebilir. Dolayısıyla, CD3+CD4+CD25+ hücrelerin yüzeyindeki ölümcül ligand ekspresyon miktarlarının sağlıklı kontroller ve hasta örnekleri arasında anlamlı bir farklılık göstermediğini söylemek daha uygun olabilir.

Çalışmamız esnasında kullandığımız hasta ve kontrol kan örnekleri gönüllülük esasına dayanarak alınmıştır. Sağlıklı kontrollerin yanı sıra, MM hastalarının da, herhangi bir otoimmün hastalıktan veya tip 2 diyabetten muzdarip olmaması, anti-depresan ilaç kullanmaması, kalp krizi hikayesi/koroner arter hastalığının olmaması kriterleri aranmıştır. Zira bu hastalıklarda, kan dolaşımındaki sitokin konsantrasyonlarının değiştiği, özellikle serum IL-2 ve bazı inflamatuvar sitokinlerin konsantrasyonlarının arttığı [128-130], dolayısıyla da FasL/TRAIL ekspresyonu için daha uygun ortam olduğu bilinmektedir. Ayrıca statin gibi kolesterol ilaçlarının bağışıklık sistemini etkileyebileceği düşünülmüş ve bu durumda da kontrol kan örnekleri değerlendirmeye alınmamıştır.

Tez çalışmamız sonucunda elde edilen bütün veriler göz önüne alındığında, bağışıklık sisteminde herhangi bir kusur ya da fazladan uyarıya yol açacak faktörler olmayan sağlıklı kontroller ile yine aynı durumdaki MM hastalarına ait sitotoksik lenfositler arasında FasL ve TRAIL ekspresyon profillerinin farklı olduğu görülmüştür. Çalışma sonuçlarımıza göre bu farklılık, ölümcül ligand ekspresyonu gösteren hücre sayısı/oranından ziyade, hücre başına düşen ligand sayısından kaynaklanmaktadır. FasL ve TRAIL ekspresyonlarındaki düşmeye yol açabilecek muhtemel nedenlerden biri, Multiple Myeloma hastalarının serumlarındaki yüksek IL-6 sitokin konsantrasyonu olabilir [131]. Zira literatürde mevcut çalışmalar, IL-6'nın, IL-2 varlığında dahi FasL ekspresyonunu ve FasL aracılı apoptozu engelleyebildiğini göstermiştir [119, 132]. MM

hastalarına ait periferik kan lenfositlerindeki azalmış ölümcül ligand ekspresyonu, hastaların sürekli tekrarlayan enfeksiyonlardan muzdarip olmasının altında yatan nedenlerden biri olabileceği gibi, “immune-surveillance” mekanizmasının kusurlu noktalarından birini teşkil ediyor da olabilir. Dolayısıyla lenfositlerdeki bu kusuru düzeltmek adına dışarıdan FasL/TRAIL gen nakli, MM tedavisinde umut veren bir strateji olarak değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

1. Kyle, R.A. and D.P. Steensma, *History of multiple myeloma*. Recent Results Cancer Res, 2011. **183**: p. 3-23.
2. Dalrymple, J., *On the microscopical character of mollitiesossium*. Dublin Quarterly Journal of Medical Science, 1846. **2**: p. 85-95.
3. Kyle, R.A., *Multiple myeloma: an odyssey of discovery*. Br J Haematol, 2000. **111**(4): p. 1035-44.
4. Raab, M.S., et al., *Multiple myeloma*. Lancet, 2009. **374**(9686): p. 324-39.
5. Pottern, L.M., et al., *HLA and multiple myeloma among black and white men: evidence of a genetic association*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1992. **1**(3): p. 177-82.
6. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2012. **62**(1): p. 10-29.
7. Blattner, W.A., R.J. Jacobson, and G. Shulman, *Multiple myeloma in South African blacks*. Lancet, 1979. **1**(8122): p. 928-9.
8. Jemal, A., et al., *Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(23): p. 1672-94.
9. Howe, H.L., et al., *Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2003, featuring cancer among U.S. Hispanic/Latino populations*. Cancer, 2006. **107**(8): p. 1711-42.
10. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2005*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(1): p. 10-30.
11. Anderson, K.C. and R.D. Carrasco, *Pathogenesis of myeloma*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 249-74.
12. Kyle, R.A., *Monoclonal gammopathy of undetermined significance*. Blood Rev, 1994. **8**(3): p. 135-41.
13. Pruzanski, W. and A. Katz, *Clinical and laboratory findings in primary generalized and multiple-myeloma-related amyloidosis*. Can Med Assoc J, 1976. **114**(10): p. 906-9.
14. Beetham, R., et al., *Can serum free light chains replace urine electrophoresis in the detection of monoclonal gammopathies?* Ann Clin Biochem, 2007. **44**(Pt 6): p. 516-22.
15. Rajkumar, S.V., *Multiple myeloma: 2011 update on diagnosis, risk-stratification, and management*. Am J Hematol, 2011. **86**(1): p. 57-65.
16. Greipp, P.R., et al., *International staging system for multiple myeloma*. J Clin Oncol, 2005. **23**(15): p. 3412-20.
17. Lynch, H.T., et al., *Phenotypic heterogeneity in multiple myeloma families*. J Clin Oncol, 2005. **23**(4): p. 685-93.
18. Altieri, A., et al., *Familial risks and temporal incidence trends of multiple myeloma*. Eur J Cancer, 2006. **42**(11): p. 1661-70.
19. Ozet, A., S. Guran, and M. Beksac, *Familial multiple myeloma associated with disorders of chronic inflammation: first report from Turkey*. Clin Lymphoma Myeloma, 2008. **8**(4): p. 246-8.

20. Zandecki, M., J.L. Lai, and T. Facon, *Multiple myeloma: almost all patients are cytogenetically abnormal*. Br J Haematol, 1996. **94**(2): p. 217-27.
21. Fonseca, R., et al., *The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma*. Blood, 2003. **102**(7): p. 2562-7.
22. Tricot, G., et al., *Poor prognosis in multiple myeloma is associated only with partial or complete deletions of chromosome 13 or abnormalities involving 11q and not with other karyotype abnormalities*. Blood, 1995. **86**(11): p. 4250-6.
23. Bergsagel, P.L. and W.M. Kuehl, *Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma*. J Clin Oncol, 2005. **23**(26): p. 6333-8.
24. Kuehl, W.M. and P.L. Bergsagel, *Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(3): p. 175-87.
25. Willis, T.G. and M.J. Dyer, *The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies*. Blood, 2000. **96**(3): p. 808-22.
26. Chesi, M., et al., *Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3*. Nat Genet, 1997. **16**(3): p. 260-4.
27. Plowright, E.E., et al., *Ectopic expression of fibroblast growth factor receptor 3 promotes myeloma cell proliferation and prevents apoptosis*. Blood, 2000. **95**(3): p. 992-8.
28. Fonseca, R., et al., *Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma*. Blood, 2003. **101**(11): p. 4569-75.
29. Chesi, M., et al., *Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma*. Blood, 1998. **91**(12): p. 4457-63.
30. Shaughnessy, J., Jr., et al., *Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent chromosomal translocations to immunoglobulin loci in multiple myeloma*. Blood, 2001. **98**(1): p. 217-23.
31. Janssen, J.W., et al., *Concurrent activation of a novel putative transforming gene, myeov, and cyclin D1 in a subset of multiple myeloma cell lines with t(11;14)(q13;q32)*. Blood, 2000. **95**(8): p. 2691-8.
32. Kalakonda, N., et al., *Detection of N-Ras codon 61 mutations in subpopulations of tumor cells in multiple myeloma at presentation*. Blood, 2001. **98**(5): p. 1555-60.
33. Liu, P., et al., *Activating mutations of N- and K-ras in multiple myeloma show different clinical associations: analysis of the Eastern Cooperative Oncology Group Phase III Trial*. Blood, 1996. **88**(7): p. 2699-706.
34. Guillermin, G., et al., *Different prognostic values of p15(INK4b) and p16(INK4a) gene methylations in multiple myeloma*. Haematologica, 2003. **88**(4): p. 476-8.
35. Zhan, F., et al., *Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells*. Blood, 2002. **99**(5): p. 1745-57.
36. Ehrlich, P., *Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung*. Ned. Tijdschr. Geneeskde, 1909. **5**: p. 56.
37. Moore, A.E., C.P. Rhoads, and C.M. Southam, *Homotransplantation of human cell lines*. Science, 1957. **125**(3239): p. 158-60.
38. Burnet, M., *Immunological Factors in the Process of Carcinogenesis*. Br Med Bull, 1964. **20**: p. 154-8.
39. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p.

- 57-70.
40. Zitvogel, L., A. Tesniere, and G. Kroemer, *Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 715-27.
 41. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 137-48.
 42. Zou, W., *Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(4): p. 263-74.
 43. Basak, G.W., et al., *Multiple myeloma bone marrow niche*. Curr Pharm Biotechnol, 2009. **10**(3): p. 345-6.
 44. Mitsiades, C.S., et al., *Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors*. Cancer Cell, 2004. **5**(3): p. 221-30.
 45. Hideshima, T., et al., *Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(8): p. 585-98.
 46. Brimnes, M.K., I.M. Svane, and H.E. Johnsen, *Impaired functionality and phenotypic profile of dendritic cells from patients with multiple myeloma*. Clin Exp Immunol, 2006. **144**(1): p. 76-84.
 47. Ratta, M., et al., *Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6*. Blood, 2002. **100**(1): p. 230-7.
 48. Treon, S.P. and K.C. Anderson, *Interleukin-6 in multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias*. Curr Opin Hematol, 1998. **5**(1): p. 42-8.
 49. Jourdan, M., et al., *A major role for Mcl-1 antiapoptotic protein in the IL-6-induced survival of human myeloma cells*. Oncogene, 2003. **22**(19): p. 2950-9.
 50. Xie, J., et al., *Beta 2-microglobulin as a negative regulator of the immune system: high concentrations of the protein inhibit in vitro generation of functional dendritic cells*. Blood, 2003. **101**(10): p. 4005-12.
 51. Kukreja, A., et al., *Enhancement of clonogenicity of human multiple myeloma by dendritic cells*. J Exp Med, 2006. **203**(8): p. 1859-65.
 52. Rivollier, A., et al., *Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment*. Blood, 2004. **104**(13): p. 4029-37.
 53. Chauhan, D., et al., *Functional interaction of plasmacytoid dendritic cells with multiple myeloma cells: a therapeutic target*. Cancer Cell, 2009. **16**(4): p. 309-23.
 54. Wen, Y.J., et al., *Idiotypic protein-pulsed adherent peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells prime immune system in multiple myeloma*. Clin Cancer Res, 1998. **4**(4): p. 957-62.
 55. Wen, Y.J., M. Ling, and S.H. Lim, *Immunogenicity and cross-reactivity with idiotypic IgA of VH CDR3 peptide in multiple myeloma*. Br J Haematol, 1998. **100**(3): p. 464-8.
 56. Curti, A., et al., *Phase I/II clinical trial of sequential subcutaneous and intravenous delivery of dendritic cell vaccination for refractory multiple myeloma using patient-specific tumour idioype protein or idioype (VDJ)-derived class I-restricted peptides*. Br J Haematol, 2007. **139**(3): p. 415-24.
 57. Raje, N., et al., *Tumour cell/dendritic cell fusions as a vaccination strategy for multiple myeloma*. Br J Haematol, 2004. **125**(3): p. 343-52.

58. Markiewicz, M.A. and T.F. Gajewski, *The immune system as anti-tumor sentinel: molecular requirements for an anti-tumor immune response*. Crit Rev Oncog, 1999. **10**(3): p. 247-60.
59. Miller, J.F., *Immunological function of the thymus*. Lancet, 1961. **2**(7205): p. 748-9.
60. Romagnani, S., *Th1/Th2 cells*. Inflamm Bowel Dis, 1999. **5**(4): p. 285-94.
61. Weaver, C.T., et al., *Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties*. Immunity, 2006. **24**(6): p. 677-88.
62. Carding, S.R. and P.J. Egan, *Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 336-45.
63. Godfrey, D.I. and S.P. Berzins, *Control points in NKT-cell development*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(7): p. 505-18.
64. Kagi, D., et al., *Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity*. Science, 1994. **265**(5171): p. 528-30.
65. Cook, G., et al., *Transforming growth factor beta from multiple myeloma cells inhibits proliferation and IL-2 responsiveness in T lymphocytes*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(6): p. 981-8.
66. Bianchi, A., et al., *Distribution of T-cell signalling molecules in human myeloma*. Br J Haematol, 1997. **97**(4): p. 815-20.
67. Brown, R.D., et al., *The expression of T cell related costimulatory molecules in multiple myeloma*. Leuk Lymphoma, 1998. **31**(3-4): p. 379-84.
68. Frassanito, M.A., A. Cusmai, and F. Dammacco, *Deregulated cytokine network and defective Th1 immune response in multiple myeloma*. Clin Exp Immunol, 2001. **125**(2): p. 190-7.
69. Mozaffari, F., et al., *Signalling molecules and cytokine production in T cells of multiple myeloma-increased abnormalities with advancing stage*. Br J Haematol, 2004. **124**(3): p. 315-24.
70. Peggs, K.S. and J.P. Allison, *Co-stimulatory pathways in lymphocyte regulation: the immunoglobulin superfamily*. Br J Haematol, 2005. **130**(6): p. 809-24.
71. Murakami, H., H. Ogawara, and H. Hiroshi, *Th1/Th2 cells in patients with multiple myeloma*. Hematology, 2004. **9**(1): p. 41-5.
72. Mariani, S., et al., *Severe and long-lasting disruption of T-cell receptor diversity in human myeloma after high-dose chemotherapy and autologous peripheral blood progenitor cell infusion*. Br J Haematol, 2001. **113**(4): p. 1051-9.
73. Moss, P., et al., *Clonal populations of CD4+ and CD8+ T cells in patients with multiple myeloma and paraproteinemia*. Blood, 1996. **87**(8): p. 3297-306.
74. Sze, D.M., et al., *Clonal cytotoxic T cells in myeloma*. Leuk Lymphoma, 2003. **44**(10): p. 1667-74.
75. Perez-Andres, M., et al., *Characterization of bone marrow T cells in monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and plasma cell leukemia demonstrates increased infiltration by cytotoxic/Th1 T cells demonstrating a skewed TCR-Vbeta repertoire*. Cancer, 2006. **106**(6): p. 1296-305.
76. Brown, R.D., et al., *The prognostic significance of T cell receptor beta gene rearrangements and idiotype-reactive T cells in multiple myeloma*. Leukemia, 1997. **11**(8): p. 1312-7.
77. Sanlioglu, A.D., et al., *Molecular mechanisms of death ligand-mediated immune modulation: a gene therapy model to prolong islet survival in type 1 diabetes*. J

- Cell Biochem, 2008. **104**(3): p. 710-20.
78. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3666-70.
 79. Pennica, D., et al., *Cloning and expression in Escherichia coli of the cDNA for murine tumor necrosis factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(18): p. 6060-4.
 80. Haranaka, K., et al., *Purification, characterization, and antitumor activity of nonrecombinant mouse tumor necrosis factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(11): p. 3949-53.
 81. Takahashi, T., et al., *Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity*. Int Immunol, 1994. **6**(10): p. 1567-74.
 82. Suda, T., et al., *Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family*. Cell, 1993. **75**(6): p. 1169-78.
 83. Pitti, R.M., et al., *Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family*. J Biol Chem, 1996. **271**(22): p. 12687-90.
 84. Wiley, S.R., et al., *Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis*. Immunity, 1995. **3**(6): p. 673-82.
 85. Janssen, O., et al., *CD95 ligand--death factor and costimulatory molecule?* Cell Death Differ, 2003. **10**(11): p. 1215-25.
 86. Bodmer, J.L., P. Schneider, and J. Tschopp, *The molecular architecture of the TNF superfamily*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(1): p. 19-26.
 87. Berg, D., et al., *Enforced covalent trimerization increases the activity of the TNF ligand family members TRAIL and CD95L*. Cell Death Differ, 2007. **14**(12): p. 2021-34.
 88. Andera, L., *Signaling activated by the death receptors of the TNFR family*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2009. **153**(3): p. 173-80.
 89. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Apoptosis control by death and decoy receptors*. Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(2): p. 255-60.
 90. Trauth, B.C., et al., *Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis*. Science, 1989. **245**(4915): p. 301-5.
 91. Nagata, S., *Fas ligand-induced apoptosis*. Annu Rev Genet, 1999. **33**: p. 29-55.
 92. Itoh, N., et al., *The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis*. Cell, 1991. **66**(2): p. 233-43.
 93. Watanabe-Fukunaga, R., et al., *Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis*. Nature, 1992. **356**(6367): p. 314-7.
 94. Hymowitz, S.G., et al., *Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5*. Mol Cell, 1999. **4**(4): p. 563-71.
 95. Sprick, M.R., et al., *FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2*. Immunity, 2000. **12**(6): p. 599-609.
 96. Marsters, S.A., et al., *A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain*. Curr Biol, 1997. **7**(12): p. 1003-6.
 97. Degli-Esposti, M.A., et al., *Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family*. J Exp Med, 1997. **186**(7): p. 1165-70.

98. Clancy, L., et al., *Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(50): p. 18099-104.
99. Emery, J.G., et al., *Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL*. J Biol Chem, 1998. **273**(23): p. 14363-7.
100. Truneh, A., et al., *Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor*. J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 23319-25.
101. Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich, *Tumor necrosis factor signaling*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 45-65.
102. Seol, J.Y., et al., *Adenovirus-TRAIL can overcome TRAIL resistance and induce a bystander effect*. Cancer Gene Ther, 2003. **10**(7): p. 540-8.
103. Grell, M., et al., *The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor*. Cell, 1995. **83**(5): p. 793-802.
104. Wajant, H., et al., *Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative*. Oncogene, 2001. **20**(30): p. 4101-6.
105. Schneider, P., et al., *Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity*. J Exp Med, 1998. **187**(8): p. 1205-13.
106. Sanlioglu, A.D., et al., *Surface TRAIL decoy receptor-4 expression is correlated with TRAIL resistance in MCF7 breast cancer cells*. BMC Cancer, 2005. **5**: p. 54.
107. Sanlioglu, A.D., et al., *TRAIL death receptor-4 expression positively correlates with the tumor grade in breast cancer patients with invasive ductal carcinoma*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007. **69**(3): p. 716-23.
108. Sanlioglu, A.D., et al., *High TRAIL death receptor 4 and decoy receptor 2 expression correlates with significant cell death in pancreatic ductal adenocarcinoma patients*. Pancreas, 2009. **38**(2): p. 154-60.
109. Sanlioglu, A.D., et al., *Differential expression of TRAIL and its receptors in benign and malignant prostate tissues*. J Urol, 2007. **177**(1): p. 359-64.
110. Koksai, I.T., et al., *Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-R4 decoy receptor expression is correlated with high Gleason scores, prostate-specific antigen recurrence, and decreased survival in patients with prostate carcinoma*. Urol Oncol, 2008. **26**(2): p. 158-65.
111. Min, Y.J., et al., *Prognostic significance of Fas (CD95) and TRAIL receptors (DR4/DR5) expression in acute myelogenous leukemia*. Leuk Res, 2004. **28**(4): p. 359-65.
112. Kojima, Y., et al., *Fas and Fas ligand expression on germinal center type-diffuse large B-cell lymphoma is associated with the clinical outcome*. Eur J Haematol, 2006. **76**(6): p. 465-72.
113. Ravandi, F., et al., *Expression of apoptosis proteins in chronic myelogenous leukemia: associations and significance*. Cancer, 2001. **91**(11): p. 1964-72.
114. Young, K.H., et al., *Mutations in the DNA-binding codons of TP53, which are associated with decreased expression of TRAILreceptor-2, predict for poor survival in diffuse large B-cell lymphoma*. Blood, 2007. **110**(13): p. 4396-405.
115. Tansey, M.G. and D.E. Szymkowski, *The TNF superfamily in 2009: new*

- pathways, new indications, and new drugs. *Drug Discov Today*, 2009. **14**(23-24): p. 1082-8.
116. Berg, M., et al., *Clinical-grade ex vivo-expanded human natural killer cells up-regulate activating receptors and death receptor ligands and have enhanced cytolytic activity against tumor cells*. *Cytotherapy*, 2009. **11**(3): p. 341-55.
 117. Kayagaki, N., et al., *Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells*. *J Immunol*, 1999. **163**(4): p. 1906-13.
 118. Kayagaki, N., et al., *Involvement of TNF-related apoptosis-inducing ligand in human CD4+ T cell-mediated cytotoxicity*. *J Immunol*, 1999. **162**(5): p. 2639-47.
 119. Chauhan, D., et al., *Interleukin-6 inhibits Fas-induced apoptosis and stress-activated protein kinase activation in multiple myeloma cells*. *Blood*, 1997. **89**(1): p. 227-34.
 120. Lincz, L.F., T.X. Yeh, and A. Spencer, *TRAIL-induced eradication of primary tumour cells from multiple myeloma patient bone marrows is not related to TRAIL receptor expression or prior chemotherapy*. *Leukemia*, 2001. **15**(10): p. 1650-7.
 121. Mitsiades, C.S., et al., *TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications*. *Blood*, 2001. **98**(3): p. 795-804.
 122. Gazitt, Y., *TRAIL is a potent inducer of apoptosis in myeloma cells derived from multiple myeloma patients and is not cytotoxic to hematopoietic stem cells*. *Leukemia*, 1999. **13**(11): p. 1817-24.
 123. Shima, Y., et al., *Myeloma cells express Fas antigen/APO-1 (CD95) but only some are sensitive to anti-Fas antibody resulting in apoptosis*. *Blood*, 1995. **85**(3): p. 757-64.
 124. Locklin, R.M., et al., *Agonists of TRAIL death receptors induce myeloma cell apoptosis that is not prevented by cells of the bone marrow microenvironment*. *Leukemia*, 2007. **21**(4): p. 805-12.
 125. Smyth, M.J., et al., *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis*. *J Exp Med*, 2001. **193**(6): p. 661-70.
 126. Bossi, G. and G.M. Griffiths, *Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells*. *Nat Med*, 1999. **5**(1): p. 90-6.
 127. Kojima, Y., et al., *Localization of Fas ligand in cytoplasmic granules of CD8+ cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells: participation of Fas ligand in granule exocytosis model of cytotoxicity*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **296**(2): p. 328-36.
 128. Oncul, O., et al., *Serum interleukin 2 levels in patients with rheumatoid arthritis and correlation with insulin sensitivity*. *J Int Med Res*, 2002. **30**(4): p. 386-90.
 129. Ebrinc, S., et al., *Serum interleukin 1 alpha and interleukin 2 levels in patients with schizophrenia*. *J Int Med Res*, 2002. **30**(3): p. 314-7.
 130. Bossowska, A., A. Bossowski, and B. Galar, *Analysis of apoptotic markers Fas/FasL (CD95/CD95L) expression on the lymphocytes in patients with acute coronary syndrome*. *Kardiol Pol*, 2007. **65**(8): p. 883-9; discussion 890-2.
 131. Frassanito, M.A., et al., *Fas/Fas ligand (FasL)-deregulated apoptosis and IL-6 insensitivity in highly malignant myeloma cells*. *Clin Exp Immunol*, 1998.

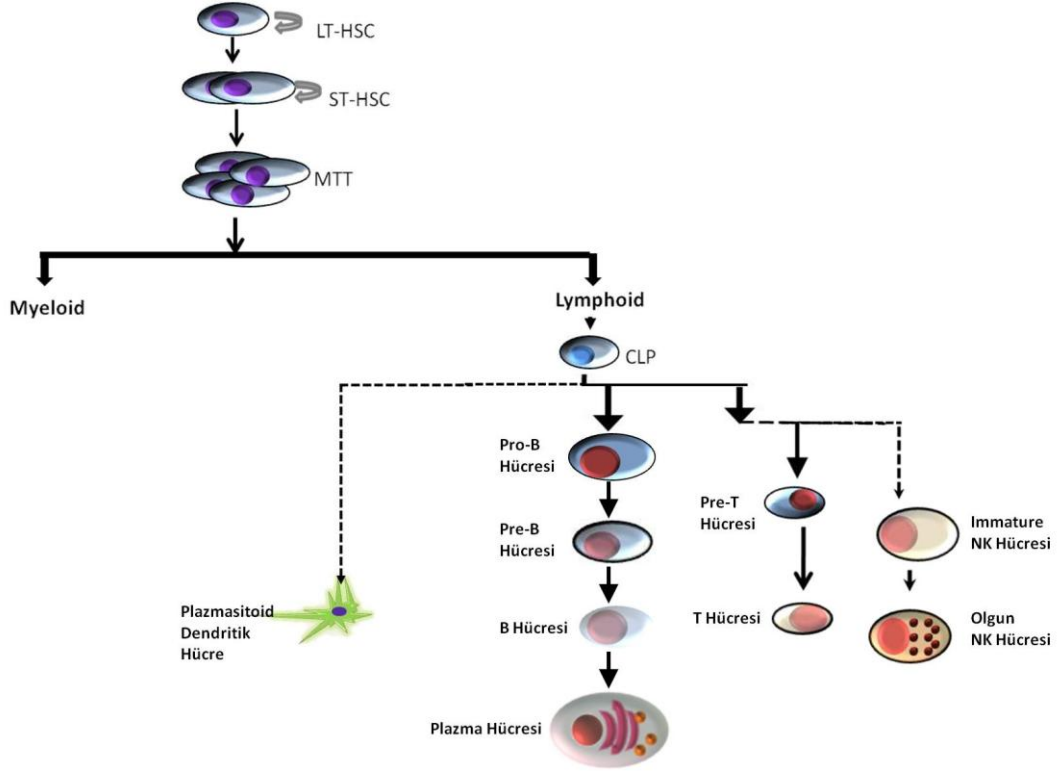
- 114**(2): p. 179-88.
132. Ayroldi, E., et al., *Interleukin-6 (IL-6) prevents activation-induced cell death: IL-2-independent inhibition of Fas/fasL expression and cell death*. *Blood*, 1998. **92**(11): p. 4212-9.

ÖZGEÇMİŞ

8 Nisan 1988 doğumlu Fatma Zehra Hapil, lise eğitimini Antalya Anadolu Lisesi'nde tamamlamış, 2004 yılında Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde lisans eğitimine başlamıştır. 2007 yılında Würzburg Üniversitesi (Almanya) Nörobiyoloji ve Genetik Bölümünde Doç.Dr. Bertram Gerber'in danışmanlığı altında 2 aylık stajını tamamlamıştır. 2008 yılında, şeref derecesiyle Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünden mezun olmuş, Eylül-Aralık ayları arasında Karolinska Enstitüsü Huddinge Hastanesi Hematoloji Bölümü altındaki Gen ve Hücre Tedavi Grubu'nda 3 aylık staj yapmıştır. 2009 yılı Ocak ayından itibaren ise Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Gen Tedavi Ünitesi'nde Prof.Dr. Salih Şanhoğlu'nun danışmanlığı altında staj yaparak laboratuarda devam etmekte olan projelere iştirak etmiştir. Bu dönemde, Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından gerçekleştirilen Deney Hayvanları Sertifika Programı'na katılarak deney hayvanları kullanım sertifikası almıştır. Eylül 2009 tarihinden itibaren yine Prof.Dr. Salih Şanhoğlu'nun danışmanlığı altında Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Yüksek Lisans Programı'nda öğrenim görmeye başlamıştır. 25 Ağustos - 4 Eylül 2010 tarihleri arasında Finlandiya'nın Kuopio kentinde Avrupa Moleküler Biyoloji Organizasyonu (EMBO) denetimi altında gerçekleştirilen Gen Tedavide Viral Vektörler (Viral Vectors in Gene Therapy) pratik kursuna katılarak, güncel gen tedavi yaklaşımlarını, lentiviral vektör üretim ve saflaştırma metotlarını öğrenmiştir. Akademik kariyerine Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda kayıtlı yüksek lisans öğrencisi olarak devam etmektedir.

EKLER

EK 1: HEMATOPOEZDE PLAZMA HÜCRE GELİŞİMİ



Ek Şekil: Hematopoezde plazma hücre farklılaşması:

Hematopoietik kök hücreler kemik iliğinde lenfoid ve myeloid orjinlere ayrılır. B hücreleri, plazmasitoid dendritik hücreler, T hücreleri ve NK hücreleri lenfoid orjinden köken alırlar. T hücreleri olgunlaşma süreci timusta geçirirken, B hücreleri kemik iliğinde olgunlaşır. B hücrelerinin de olgunlaşması sonucunda immunoglobulin salgılama kapasitesine sahip plazma hücreleri oluşur. B hücrelerinin klonal yayılımı ve farklılaşması esnasında geçirdiği mutasyonlar sonrasında plazma hücre klonlarından birinin malin hale gelerek kemik iliğinde birikmesi sonucunda MM oluşur.