

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**MANTLE HÜCRELİ LENFOMADA
ÖKARYOTİK ELONGASYON FAKTÖR-2 KİNAZ
EKSPRESYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Özgür ÖZKAYAR

UZMANLIK TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

Ankara 2015

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**MANTLE HÜCRELİ LENFOMADA
ÖKARYOTİK ELONGASYON FAKTÖR-2 KİNAZ
EKSPRESYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Özgür ÖZKAYAR

UZMANLIK TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ayşegül ÜNER

Ankara 2015

TEŞEKKÜR

Patoloji uzmanlık eğitimim boyunca bana inanan ve destekleyen, hematopatolojiyi sevdiren, eğitimim yanı sıra özel sorunlarımda da desteğini esirgemeyen, patoloji uzmanı ve bir araştırmacı adayı olarak sayesinde geleceğimden daha az kaygı duyduğum tez danışmanım Prof. Dr. Ayşegül Üner'e,

ABD MD Anderson Kanseri Araştırma Merkezi'nde Deneysel Tedavi Araştırmaları Bölümü'ndeki laboratuvarında deneylerimin büyük kısmını planlayan ve gerçekleştirmemde her türlü desteği sağlayan Doç. Dr. Bülent Özpola'ta, bu laboratuvarında birlikte çalıştığım hücre kültürü ve Western blot deneylerimin bir kısmını birlikte yaptığımız ve birçok tekniği birebir öğreten arkadaşım Nermin Mak Kahraman'a,

Bölümümüz arşivinden blok ve preparatların teminini sağlayan ve her ihtiyacım olduğunda yardıma koşan arşiv görevlimiz Lokman Kale'ye, kesitleri titizlikle hazırlayan başteknisyenimiz Faruk Ünsal'a, tümör patolojisi laboratuvarında immünohistokimyasal çalışmalarda bana yardım eden biyolog Murat Aytekin'e,

ABD'de MD Anderson Kanseri Araştırma Merkezi'nde deneylerimi gerçekleştirmem için yurt dışı eğitim desteği sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ve birim başkanı Dr. Gülnur Güler'e,

Bölümümüz asistan hekimlerinin yurt dışı eğitimlerine önem vererek destek olan ve bu sayede yurt dışında deneylerimi gerçekleştirmeme vesile olan başta bölüm başkanımız Prof. Dr. Dilek Ertoylu Baydar olmak üzere tüm hocalarıma,

Uzmanlık eğitimim ve özellikle de tez yazım günlerimde her anımda bana sonsuz destek olan sevgili eşime,

teşekkür ederim.

Dr. Özgür ÖZKAYAR

ÖZET

Özkayar Ö, Mantle hücreli lenfomada ökaryotik elongasyon faktör-2 kinaz ekspresyonunun değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi, Tıbbi Patoloji, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2015

Mantle hücreli lenfoma agresif bir B hücreli lenfoma alt tipidir. Konvansiyonel kemoterapi ile yüksek remisyon oranları elde edilebilse de kür nadirdir. Bu nedenle yeni ve daha etkili tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi için hastalığın patogenezi ve biyolojisini anlamaya yönelik çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışmada Mantle hücreli lenfomada (MHL) ökaryotik elongasyon faktör-2 kinaz (eEF-2K) ekspresyonu varlığı Mantle hücreli lenfoma (MHL) olgularına ait biyopsi örneklerinde immünohistokimyasal olarak ve MHL hücre hatlarında (JeKo-1, Granta-519, Mino ve SP53) Western blot yöntemiyle araştırılmıştır. Bu kapsamda Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2000-2013 yılları arasında tanı almış toplam 39 MHL olgusu değerlendirilmiştir. MHL hücre hatlarında, Rottlerin ile eEF-2K inhibisyonu yapılmış ve MTS yöntemiyle hücre proliferasyonu değerlendirilmiştir. Western blot çalışmalarında MHL hücrelerinde Rottlerin kullanılarak eEF-2K inhibisyonu ile siklin D1 seviyeleri, otofajik ve apoptotik proteinler değerlendirilmiştir. eEF-2K siRNA kullanılarak gerçekleştirilen RNA interferansı deneyinde siklin D1 ve c-Myc ekspresyonu araştırılmıştır. Hasta örneklerinde 39 hastanın 26'sında (%64,1) ve hücre hatlarında özellikle JeKo-1 ve Mino hücrelerinde eEF-2K ekspresyonu saptanmıştır. Rottlerin ile 4 MHL hücre hattında da MTS çalışması ile proliferasyon inhibisyonu gösterilmiştir. Western blot deneylerinde JeKo-1 ve Granta-519 hücrelerinde Rottlerin kullanılarak eEF-2K inhibisyonunun siklin D1 inhibisyonuna yol açtığı ve JeKo-1 hücrelerinde otofaji ve apoptoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. RNA interferansı yöntemiyle eEF-2K siRNA kullanarak eEF-2K inhibisyonu JeKo-1 hücrelerinde siklin D1 ve c-Myc'te azalma ile sonuçlanmıştır. Bu çalışma MHL'de eEF-2K ekspresyonu varlığını göstermesi açısından önemlidir. MHL'de eEF-2K ve ilişkili yolların hastalığın patogeneziindeki yerinin ayrıntılı tanımlanması MHL tedavisinde terapötik değer taşıyabilir.

Anahtar kelimeler: Mantle hücreli lenfoma, eEF-2K, otofaji, apoptoz

ABSTRACT

Özkayar Ö, The evaluation of eukaryotic elongation factor-2 kinase expression in Mantle cell lymphoma, Hacettepe University, Thesis of Pathology, Ankara, 2015

Mantle cell lymphoma is an aggressive type of B cell lymphoma. Although it is possible to achieve high remission rates with conventional chemotherapy, cure is rare. Therefore, studies aimed at understanding the pathogenesis and biology of the disease in order to develop new and more effective treatment strategies continues. In this study, the expression of eukaryotic elongation factor-2 kinase (eEF-2K) in Mantle cell lymphoma (MCL) was investigated using immunohistochemistry in biopsy samples and by Western blotting in MCL cell lines. A total of 39 MCL cases diagnosed in Hacettepe University Hospital, Department of Pathology between the years of 2000-2013 and 4 MCL cell lines (JeKo-1, Granta-519, Mino and SP53) were included in the study. The cell proliferation changes induced by Rottlerin inhibition of eEF-2K were evaluated by MTS assay. Cyclin D1 expression, autophagic and apoptotic protein expressions effected by inhibition of eEF-2K with Rottlerin were evaluated by Western blotting. The cyclin D1 and c-Myc expressions were evaluated in the RNA interference experiments using eEF-2K siRNA. In 26 of 39 (64.1%) patient samples and in especially JeKo-1 and Mino cell lines, eEF-2K expression was detected. In all four cell lines, the inhibition of cell proliferation was observed with the Rottlerin treatment. It was shown that, inhibition of eEF-2K with Rottlerin treatment, caused down-regulation of cyclin D1 in JeKo-1 and Granta-519 cells and related with the autophagy and apoptosis in JeKo-1 cells. Using RNA interference method, inhibition of eEF-2K with eEF-2K siRNA resulted in down-regulation of cyclin D1 and c-Myc. This study is important because it indicates the presence of the eEF-2K expression in MCL. In MCL, the detailed investigation of the eEF-2K targets and related downstream pathways in the pathogenesis of this disease, may have therapeutic importance.

Keywords: Mantle cell lymphoma, eEF-2K, autophagy, apoptosis

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. MORFOLOJİ.....	2
2.2. FENOTİP.....	4
2.3. PATOGENEZ.....	6
2.3.1. Siklin D1.....	6
2.3.2. Siklin D1 Negatif MHL.....	7
2.3.3. İlave Sitogenetik Bozukluklar.....	7
2.3.4. Sekonder Değişimler.....	8
3. MATERYAL METOD.....	14
3.1. DENEYSEL TASARIM.....	14
3.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR.....	14
3.3. MANTLE HÜCRELİ LENFOMA HÜCRE HATLARI.....	15
3.4. HÜCRE PROLİFERASYON DENEYLERİ.....	16
3.5. WESTERN BLOT ANALİZLERİ.....	16
3.6. siRNA İle TRANSFEKSİYON.....	17
4. BULGULAR.....	18
4.1. MANTLE HÜCRELİ LENFOMA HASTALARINA AİT KESİTLERDE eEF-2K EKSPRESYONUNUN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ANALİZİ.....	18
4.2. MHL HÜCRE HATLARINDA WESTERN BLOT YÖNTEMİYLE eEF- 2K EKSPRESYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	20
4.3. ROTTLERİN UYGULAMASI İLE MHL HÜCRE HATLARINDA HÜCRE PROLİFERASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	20

4.4. ROTTLERİN UYGULAMASI SONRASINDA WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE JEKO-1 VE GRANTA-519 HÜCRELERİNDE eEF-2K, SİKLİN D1 EKSPRESYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ VE OTOFAJİ İLE İLİŞKİSİNİN GÖSTERİLMESİ	22
4.5. ROTTLERİN UYGULAMASI SONRASINDA WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE JEKO-1 HÜCRELERİNDE APOPTOZ İNDÜKSİYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ	23
4.6. JEKO-1 HÜCRE HATTINDA siRNA ile eEF-2K İNHİBİSYONU SONRASI SİKLİN D1 ve c-MYC EKSPRESYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	24
5. TARTIŞMA.....	25
6. SONUÇ.....	30
7. KAYNAKLAR	31

KISALTMALAR

AMPK	:	AMP ile aktive edilen kinaz
ATM	:	Ataxia telangiectasia mutated
eEF2	:	Ökaryotik elongasyon faktör-2
eEF-2K	:	Ökaryotik elongasyon faktör-2 kinaz
FISH	:	Floresan in situ hibridizasyon
İSMHL	:	İn situ mantle hücreli lenfoma
KLL	:	Kronik lenfositik lösemi/lenfoma
MHL	:	Mantle hücreli lenfoma
MLP	:	Multipl lenfomatöz polipozis
PZR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
RB1	:	Retinoblastoma-1

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

- Şekil 2.1.** Normal dokularda ve tümörlerde eEF-2K'nin rolüne ilişkin şematik anlatım (89).12
- Şekil 4.1.** Mantle hücreli lenfoma vakalarında immünohistokimyasal yöntemle saptanan kuvvetli eEF-2K ekspresyonu.18
- Şekil 4.2.** Mantle hücreli lenfoma vakalarında immünohistokimyasal yöntemle saptanan orta şiddette eEF-2K ekspresyonu.19
- Şekil 4.3.** Mantle hücreli lenfoma vakalarında immünohistokimyasal yöntemle eEF-2K ekspresyonu için negatif olan bir olgu.....19
- Şekil 4.4.** MHL hücre hatlarında Western blot yöntemiyle saptanan eEF-2K ekspresyonu. Ekspresyon JeKo-1 ve Mino hücrelerinde belirgindir.20
- Şekil 4.5.** Rottlerin uygulaması ile JeKo-1, Mino, Granta-519 ve SP53 hücre hatlarında 72 saat zaman noktasında gözlenen proliferasyon inhibisyonu. İnhibisyon özellikle JeKo-1 ve Mino hücrelerinde belirgindir.21
- Şekil 4.6.** JeKo-1 ve Granta-519 hücrelerinde artan Rottlerin dozları ile eEF-2K ve siklin D1 ekspresyonlarında azalma izlenmiştir. Her iki hücrede de Rottlerin uygulaması eEF-2K inhibisyonuna paralel olarak otofaji indüksiyonuna yol açmıştır.22

Şekil 4.7. JeKo-1 hücrelerinde 48 saat zaman noktasında Rottlerin uygulaması ile eEF-2K ve siklin D1 ekspresyonunda inhibisyon gözlenmektedir. Ayrıca LC3-II fraksiyonunda belirgin olarak izlenen artış Rottlerin ilişkili olarak otofaji indüksiyonuna işaret etmiştir.....23

Şekil 4.8. RNA interferansı yöntemiyle 48 saat zaman noktasında JeKo-1 hücrelerinde eEF-2K siRNA kullanılarak gerçekleştirilen RNA interferansı deneyinde siklin D1'de ve c-Myc'de ekspresyon inhibisyonu gözlenmiştir.24

1.GİRİŞ

Mantle hücreli lenfoma (MHL) 2008 Dünya Sağlık Örgütü sınıflamasına göre “*CCND1* translokasyonu gösteren ve genellikle irregüler nükleer konturlara sahip monomorfik küçük-orta boyutta lenfoid hücrelerden oluşan B hücreli neoplazmdir; neoplastik transforme hücreler, paraimmünoblastlar ve proliferasyon merkezleri içermez” (1, 2). Bu tanıma ilave olarak *CCND1* translokasyonuna sahip olmayan vakaların da bulunduğu bilinmektedir (3).

Mantle hücreli lenfoma tüm Hodgkin dışı lenfomaların %2-10'unu oluşturur (4). İnsidansı Amerik Birleşik Devletleri'nde (ABD) 0,55/100000 ve Avrupa'da 0,45/100000 olarak saptanmıştır (5, 6). Tanı anında ortalama yaş ABD'de yapılan bir çalışmada erkeklerde 67, kadınlarda 70 olarak bulunmuştur, erkeklerde daha sık görülür (E/K: 2,5/1) (4, 6). ABD'de yapılan iki ayrı çalışmada beyaz ırkta Afrika kökenli Amerikalılara kıyasla daha sık bulunmuştur (6, 7).

Hastaların büyük çoğunluğu tanı anında ileri evrededir (Ann Arbor Evre III-IV); sıklıkla, yaygın lenfadenopati, kemik iliği infiltrasyonu ve splenomegali ile presente olurlar (8-10). Periferik kanda lenfositoz ile karakterize lösemik tutulum akım sitometrik çalışmalarda hastaların %90'ından fazlasında saptanmıştır (11). Ekstranodal tutulum sıktır; özellikle gastrointestinal sistem tutulumu “Multipl lenfomatöz polipozis” (MLP) olarak bilinen ince bağırsak ve kolonda yaygın polipoid lezyonlarla karakterize klinik sunum şeklinde karşılaşılabılır; MLP çoğunlukla MHL ile ilişkilidir (12-14).

Mantle hücreli lenfoma agresif klinik gidişata sahiptir, mevcut kemoterapi olanakları ile uzun dönem remisyon elde etme şansı sınırlıdır (15, 16). Ortalama sağkalım 3-5 yıldır (1). İleri evre hastalıkta

sağkalımda artış görülmekle birlikte, lokalize hastalıkta görülen sağkalım artışı istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur (17). Tam remisyon sadece %6-35 olguda sağlanabilmektedir. Cevap süresi genellikle kısadır ve hastaların büyük çoğunluğu bir yıl içinde relaps gösterir (1). Hastalığın tanımlanmış iki indolan tipinde hayat beklentisi yüksektir. Periferik adenopati olmaksızın periferik kan, kemik iliği ve bazen dalak tutulumu bulunan hastalarda ortalama sağkalım 79 aydır (18). Diğer tip olan “İn situ mantle hücreli lenfoma” (İSMHL) olarak bilinen tipte yıllarca MHL'ye dönüşüm görülmeyebilir (19).

Tedavide sıklıkla R-CHOP protokolü tercih edilmektedir (8, 20). Bu protokol ile cevap oranı %95'inde üzerinde olmakla birlikte ilerlemesiz sağkalım ortalaması yaklaşık 16 aydır (21). Yoğun kemoterapi protokolleri (HyperCVAD) veya otolog kök hücre transplasyonu ile sağkalım artışı sağlansa da relaps yine de kaçınılmazdır (22). MHL'de relaps sonrası kemoterapi cevap hızı oldukça düşüktür (23, 24). Bu nedenle yeni terapi arayışları önem taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MORFOLOJİ

Mantle hücreli lenfoma morfolojik olarak dar sitoplazmalı, belli belirsiz nükleolü bulunan, kapalı kromatinli hafif ya da belirgin irregüler köşeli nükleuslara sahip, küçük-orta boyutta sentrositlere benzeyen hücrelerle karakterizedir (1, 22). Giemsa boyalı kesitlerde sitoplazma soluk mavi soluk gri tonlarda değişir (22). Sentroblastlara, immünoblastlara veya paraimmünoblastlara benzeyen büyük transforme hücreler görülmez (1, 25). Sıklıkla hyalinize küçük damarlar eşlik eder, çoğu vakada ara sıra yıldızlı gökyüzü manzarası da oluşturabilen tek tek dağılmış epiteloid histiyositler görülebilir (1). Lenf nodlarında bilinen üç paternde gelişim gösterirler. En yaygın olan patern diffüz gelişim paternidir, olguların yaklaşık %80'i bu paterne sahiptir (25). Lenf nodu temel yapısı neoplastik hücrelerin diffüz infiltrasyonu ile silinmiş olup, epiteloid görünümlü histiyositler ve hyalinize damarlar bunlara eşlik eder. Nodüler patern neoplastik hücrelerce oluşturulan belli belirsiz sınırlı nodüller ile karakterizedir. Mantle zon paterni en nadir görülmekte olup yaklaşık %2 vakada karşımıza çıkar; rezidüel germinal merkezlerin çevresinde neoplastik hücrelerce oluşturulan genişlemiş mantle zonlarla karakterizedir (1, 22, 25). Mantle zon paternine muhtemelen daha önceden mevcut lenfoid folliküllerin bulunmaması nedeniyle ekstranodal yerleşimlerde daha nadir rastlanır (25).

Siklin D1 immünohistokimyasının yaygınlaşmasıyla morfolojik olarak lenf nodu temel yapısının korunmuş olduğu bazı vakalarda rastlantısal olarak mantle zonlarda immünohistokimyasal siklin D1 ve değişken CD5 pozitifliği saptanmıştır (26). Sıklıkla İSMHL olarak adlandırılan bu durum mantle zon paternine sahip aşikar MHL

vakalarının aksine, genellikle mantle zonlarda genişleme olmaksızın görülür. Mantle zonların genişlediği durumlarda siklin D1 pozitif hücreler mantle zonlarda bulunan hücrelerin bir kısmını oluşturur. Bu durumun bazı sağlıklı bireylerde saptanabilen çok düşük seviyede *IGH/CCND1* füzyon transkriptleri varlığının (27) doku yansıması olduğu düşünülmektedir. Aşkar MHL gelişiminden önce İSMHL varlığı kesin değildir; vakaların tümünde olmasa da çoğunda retrospektif çalışmalarda İSMHL'in MHL'nin öncesinde bulunabildiği gösterilmiştir (28).

Periferik kan yaymalarında, neoplastik hücreler polimorfik görünümde olup küçük-orta boyuttadır. Bazı hücreler kronik lenfositik lösemi (KLL) hücrelerini andıran dar sitoplazmalı ve yuvarlak nükleuslu görünüme sahip olabilir, fakat KLL'de görülen kapalı kondanse kromatin paterni izlenmez. Nükleoller bazen soluk olarak bulunabilir, kromatin retiküler veya dantela benzeridir; çoğu vakada hücrelerin en azından bir kısmı irregüler kontürlü veya yarıklı olabilen nükleuslara sahiptir, nadiren binükleer ve trinükleer formlar görülebilir. Periferik dolaşımdaki hücrelerin yaklaşık 1/3'ünde küçük sitoplazmik vakuoller bulunabilir (29).

Kemik iliğinde tutulum daha çok diffüz veya nodülerdir, peritrabeküler veya intrasinüzoidal tutulum yaygın değildir (22, 25).

Mantle hücreli lenfomada dalak tutulumu beyaz pulpalarda neoplastik hücrelerin varlığı sonucu genişleme ile karakterizedir. Neoplastik hücreler kırmızı pulpaya da infiltrasyon gösterebilirler. Bu mikroskopik morfoloji makroskopik olarak dalakta diffüz büyüme ve beyaz noktalanma şeklinde kendini gösterir (22).

Gastrointestinal sistemde MHL, ince bağırsak ve kolonda non-spesifik lenfositik infiltratlar şeklinde karşılaşılabileceği gibi; ince

bağırsak ve kolonda çok sayıda sesil veya polipoid kitlelerle karşımıza çıkan “Multipl lenfomatoid polipozis” şeklinde kendini gösterebilir (22, 30). Multipl lenfomatoid polipoziste lezyonlar histomorfolojik olarak mukozada geniş neoplastik hücre agregatları şeklindedir, intraepitelyal neoplastik hücreler görülebilir. Nadiren ekstranodal, mukoza ilişkili lenfoid doku lenfomasında olduğu gibi lenfoepitelyal lezyonlar ile karşılaşılabilir (22).

Sitolojik olarak MHL'nin çeşitli morfolojik varyantları tanımlanmıştır (1). Bunlar değişik klinik seyirleri ve bazılarının kötü prognozları nedeniyle klinik olarak önemlidir (31). *Blastoid varyant* lenfoblastlara benzeyen küçük orta boyutta ve ince kromatinli nükleuslara sahip hücrelerle karakterizedir (32). Mitotik figürlere sık rastlanır, her büyük büyütme alanında 2-3 mitoz görülür (1). Apoptotik figürler de sıktır. Eşlik eden ve yıldızlı gökyüzü manzarasına neden olan “tingible body” makrofajlar bulunabilir. Morfolojik benzerlik nedeniyle ayırıcı tanıya lenfoblastik lenfoma girer (32). *Pleomorfik varyant* sıklıkla nükleol içeren veziküler kromatine sahip yuvarlak-irregüler nükleer sınırlı orta-büyük hücrelere karakterizedir (32). Morfolojik olarak diffüz büyük B hücreli lenfoma ayırıcı tanıda önemlidir (32). Her iki varyantın bir arada bulunması olasıdır.

Bunların dışında klinik önemi belirsiz olan küçük hücreli, marjinal zon benzeri ve plazmasitoid morfolojiye sahip varyantların da varlığı bilinmektedir (1, 22).

2.2. FENOTİP

Mantle hücreli lenfoma, tipik olarak B hücre antijenlerini eksprese eder, neoplastik hücrelerde CD19, CD20, CD22 ve CD79a pozitifdir.

Hücreler başlıca IgM ve sıklıkla da birlikte IgD yüzey immünoglobulini ekspresyonu gösterir. Lambda hafif zincir ekspresyonu kappaya göre daha sıktır (1). CD5, FMC7 ve CD43 ekspresyonu sıktır, CD23 negatiftir(22), nadiren zayıf pozitif olabilir, varlığının iyi prognozla ilişkili olduğu öne sürülmüştür. Dağılmış ve gevşek folliküler dendritik hücre ağı immünohistokimyasal olarak gösterilebilir (1). CD10 ve Bcl-6 ekspresyonu genellikle gözlenmez, aberan Bcl-6 ekspresyonu ile yaklaşık %10 vakada (33), CD10 ekspresyonu ile ise nadir vakada karşılaşılabilir (34, 35). CD5 ekspresyonu vakaların %5-17'sinde negatif olabilir (36). MUM1 ekspresyonu vakaların %35'inde görülebilir (37). Hemen tüm vakalarda Bcl-2 ekspresyonu mevcuttur (1).

Siklin D1 ekspresyonu, ki hastalığın tanımlayıcı özelliklerinden biridir, vakaların en az %95'inde immünohistokimyasal olarak saptanır (1, 22, 37, 38). Floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemiyle de siklin D1 ekspresyonunun nedeni olan translokasyonu göstermek mümkündür (39, 40). Bununla birlikte siklin D1 ekspresyonu bulunmayıp gen ekspresyon profili çalışmalarında MHL ile uyumlu bulunan MHL olguları da mevcuttur (41). Bu olgularda siklin D1 ekspresyonu bulunmasa da, morfolojik ve diğer fenotipik özellikler benzerdir ve ayrıca bunlar siklin D2 ya da siklin D3'den en az birini eksprese ederler (3). *CCND2* translokasyonu siklin D1 negatif MHL'ların yaklaşık yarısında bulunmakla birlikte *CCND3* translokasyonu daha da nadir olarak saptanabilir (42). İmmünohistokimyasal olarak siklin D2 ve siklin D3 ekspresyonlarını saptamak mümkündür ancak diğer başka B hücreli lenfomalarda da saptanabilir olmaları kullanımlarını kısıtlamaktadır (42).

Özellikle siklin D1 negatif MHL'lerde pozitiflik göstermesi ve tüm MHL'lerde yüksek sensitivitesi nedeniyle gündemde olan bir diğer belirteç SOX11'dir (43, 44). SOX11 embriyonel sinir sistemi gelişiminde görev alan bir nükleer transkripsiyon faktörüdür (44, 45). Bir seride

MHL'de vakaların %93'ünde pozitif bulunmuştur, aynı çalışmada siklin D1 negatif MHL'lerde SOX11 ekspresyonu ise %100 olarak saptanmıştır (43). Bu nedenle siklin D1 negatif MHL'lerde tanısal amaçlı kullanımı akla yatkındır. Bununla birlikte SOX11 ekspresyonu, MHL dışında lenfoblastik lenfoma, Burkitt lenfoma ve Hairy cell lösemi'de de saptanabilir (43, 46). İSMHL olgularında SOX11 ekspresyonunun klasik MHL olgularına kıyasla daha düşük olduğu bildirilmiştir (45, 47). Bu bulgunun İSMHL olgularında *IGH/CCND1* translokasyonunun patogeneizde tek "vuruş" olduğuna işaret ediyor olabileceği savunulmuştur.

2.3. PATOGENEZ

2.3.1. Siklin D1

MHL'nin ayırt edici özelliği siklin D1 ekspresyonu ile sonuçlanan *CCND1* geninin *IGH* enhancer bölgesi kontrolüne girmesine neden olan t(11;14)(q13;q32) translokasyonudur (48). Bu translokasyon patogeneizdeki başlıca genetik değişim olup, *CCND1* geninin *IGK* veya *IGL* lokuslarını ilgilendiren translokasyonlar da nadir de olsa bildirilmiştir (49). Translokasyonun işlevsel sonucu siklin D1 mRNA'sı ve proteininin kontrolsüz aşırı ekspresyonudur; ki normal lenfositlerde siklin D1 proteini eksprese edilmez (50). Translokasyon varlığı, metafaz sitogenetik çalışmaları, FISH ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile saptanabilir (1, 39, 40).

Mantle hücreli lenfoma'da farklı kesilim ile iki ayrı mRNA transkripti üretilebilir. Ekzon 1'den 5'e kadar 5 ekzonu ve 3' UTR bölgesini içeren birinci izoform ve 1'den 4'e kadar ekzonları, 4. intronun bir kısmını ve 3' UTR bölgesini içeren daha kısa ve "truncated" ikinci isoform (48, 51).

“Truncated” izoformun blastoid sitoloji, daha yüksek siklin D1 seviyeleri ve daha agresif klinik gidişat ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (1, 52).

Siklin D1 proteini hücre siklusunda görevlidir (50, 51, 53, 54). Siklin bağımlı kinaz 4/6 ile birlikte kompleks oluşturarak retinoblastom proteinini (RB1) fosforile ederler. Fosforile RB1 inaktive olarak E2F transkripsiyon faktöründen ayrılır. RB1 proteini aynı mekanizma ile siklin E/siklin bağımlı kinaz 2 tarafından da fosforile edilerek inaktive edilebilir. Bu noktada inhibisyon yapan p27 proteininin bu inhibitör etkisi, aşırı eksprese edilen siklin D1 tarafından sekestre edilerek de aşılabılır; böylece RB1 inaktivasyonu ve dolayısıyla E2F transkripsiyon faktörünün serbest kalması artar. Her iki şekilde de artan E2F, hücrede G1 fazından S fazına geçişi sağlayacak faktörlerin transkripsiyonunu artırır ve hücre siklusunda ilerleme gerçekleşir (48, 50, 51, 54).

2.3.2. Siklin D1 Negatif MHL

Gen ekspresyon profileme çalışmalarında, daha nadir olarak tipik MHL gen ekspresyon imzasına sahip ancak siklin D1 ekspresyonu göstermeyen, sekonder genetik değişimleri benzer (55) vakalar saptanmıştır ve bunlar “Siklin D1 negatif MHL” olarak adlandırılmıştır (41). Bu vakalarda siklin D2 veya siklin D3 ekspresyonları artmıştır (42, 56).

2.3.3. İlave Sitogenetik Bozukluklar

MHL patogenezinde t(11;14)(q13;q32) translokasyonu izole sitogenetik değişim olarak olguların yalnızca 1/3'ünde görülmektedir, 2/3

olguda ilave kromozomal anomaliler saptanabilir (57, 58). MHL literatürde en fazla sayıda sitogenetik değişiklik içeren lenfoma alt tipi olarak bildirilmektedir (22), bunlar başlıca 3q26, 7p21, ve 8q24'de kazanç; 1p13-p31, 6q23-27, 9p21, 11q22-23, 13q11-q13, 13q14-q34 ve 17p13pter'de kayıptır. %25 vakada trizomi 12 bildirilmiştir (1). Bunların dışında MHL'de tetraploid klonlar izlenebilir, bunlar çoğunlukla pleomorfik alt tipte görülmekte olup, bunu blastoid ve klasik morfolojiye sahip vakalar izler (59).

D tipi siklinleri ilgilendiren translokasyonlar dışında MHL'de az sayıda başka ilave translokasyon varlığı bildirilmiştir (60). Bunlardan en sık karşılaşılanı *MYC* ile *IG* genleri arasında gerçekleşen translokasyonlardır. Bildirilmiş az sayıda vakaya dayanarak bu şekildeki ilave translokasyonların varlığında morfolojinin genellikle blastoid tipte olduğu ve prognozun oldukça kötü olduğu söylenebilir (60-64).

2.3.4. Sekonder Değişimler

9p21.3'te *CDKN2A* lokusundaki homozigot delesyon ayrıntılı çalışılmıştır (65). Bu lokus p16^{INK4a} ve ARF'yi kodlayan genleri içerir. Bu delesyon daha çok blastik morfoloji ile ilişkilidir (65). Siklin D1 ve siklin bağımlı kinaz 4/6'nın retinoblastomu fosforilasyonu aşamasında p16^{INK4a} inhibitör rol oynar, böylece p16^{INK4a} kaybı hücrede G1 fazından S fazına geçişi destekler. ARF ise p53 regülatörüdür, MDM2 aracılı degradasyonunu önleyerek p53'ü stabilize eder. ARF kaybı ile p53 fonksiyon kaybı oluşur. *CDKN2A* lokusunun transkripsiyonel baskılayıcısı olan BMI1 amplifikasyon/aşırı ekspresyonu ve MDM2

ekspresyonunda artış MHL'de *CDKN2A* lokusu ilişkili patogenetik mekanizmalara katkıda bulunan diğer değişimlerdir (66).

Patogeneizde önemli değişikliklerden biri de DNA onarım bozukluklarına yol açan değişikliklerdir (67, 68). Kromozom 11q22-23'deki *ATM* (ataxia-telangiectasia-mutated) geninin kaybına yol açan delesyonlar MHL'de %40-75 arası olguda bildirilmiştir (69). Bu gen ürünü olan ATM, DNA çift zincir kırıklarında onarımda rol alan bir serin-treonin kinazdır, kaybı ile oluşan DNA onarım bozuklukları sonucu genomik instabilite ve sekonder kromozomal anomalilerde birikim görülür. *ATM* yolağında daha aşağıda yer alan iki kinaz olan ve tümör baskılayıcı gen olarak değerlendirilebilecek *CHK2* ve *CHK1*'de de delesyonlara bağlı ve mutasyonel fonksiyon kayıpları da MHL olgularında patogeneizde rol alabilmektedir (70, 71).

MYC lokusunu içeren 8q24 amplifikasyonuna olguların %16-36'sında rastlanır (1). Nadir görülen t(8;14)(q24;32) translokasyonu *MYC* lokusunu ilgilendirir ve agresif klinik gidiş ile ilgili bulunmuştur (61).

MHL hastalarında 17p13'te lokalize *TP53* geni ilişkili değişikliklere de rastlanabilir. Klasik formda MHL'de *TP53* mutasyonları nadir olsa da blastoid varyantta yaklaşık olarak %30'lara varan *TP53* mutasyon oranları bildirilmiştir (52) ve *TP53* mutasyonları kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (72).

Bir anti-apoptotik proteini kodlayan *BCL2* lokusunda amplifikasyon veya aşırı ekspresyon olguların %10-20'sinde görülebilmektedir (73, 74). *CCND1* lokusunda amplifikasyonlar yaklaşık %14 olguda bildirilmiştir ve genellikle *CCND1* lokusu ilişkili translokasyonlarla birlikte olabilir (73). Birçok hayatta kalma ve apoptoz ilişkili genin ekspresyonunu

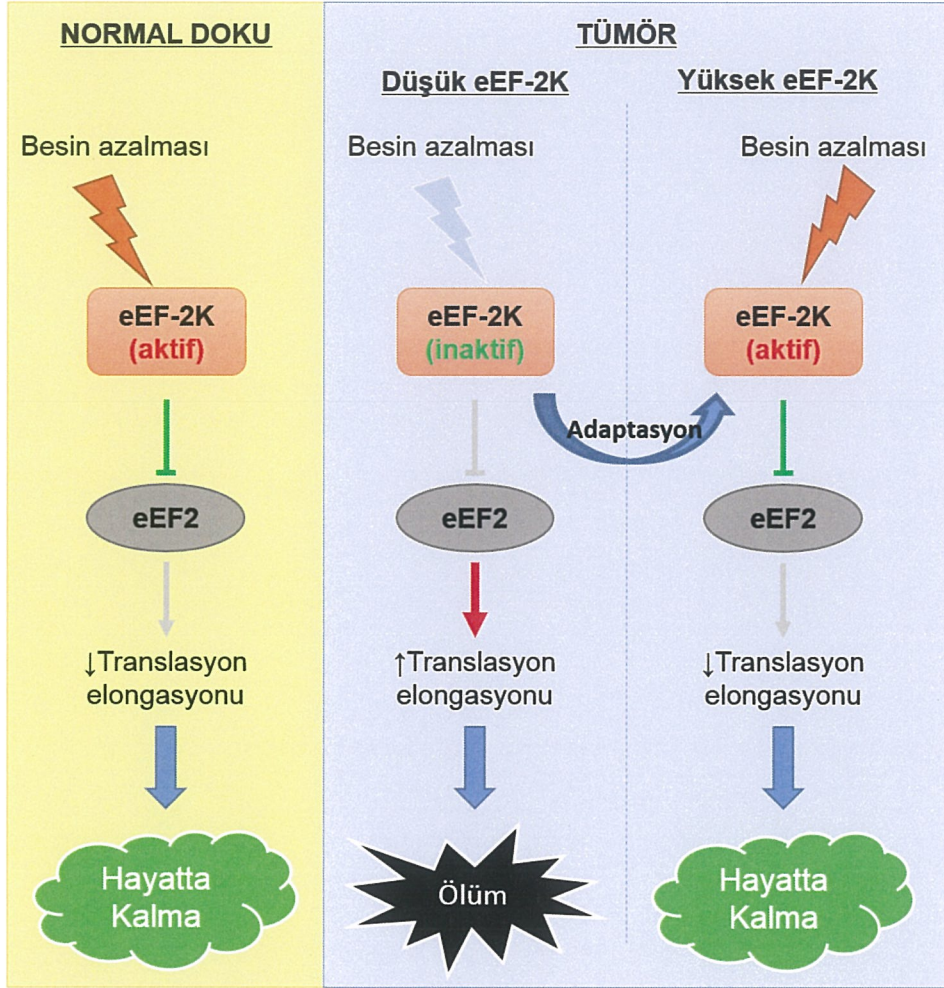
düzenleyen nükleer faktör-κB yolağı inhibitörlerinde delesyon veya inaktive edici değişimler hücre hatlarında ve primer tümörlerde bildirilmiştir (75, 76).

Mantle hücreli lenfomada olduğu gibi tüm tümörlerde kanser hücreleri için hücre siklusu ve protein sentezi üzerinde kontrol kazanmak önemlidir (77). Protein sentezinin elongasyon safhası bu kontrolde önemli rol oynar. “Nascent” proteinlerin zincir uzamasında Elongasyon faktör-2 (eEF2) kritik role sahiptir. Kodonların ribozom üzerinde A pozisyonundan P pozisyonuna transferinde görev alır (78). eEF2 aktivitesi ADP ribozillenerek veya fosforilasyon ile inaktive edilir (79). eEF2'nin ADP ribozilasyonu yolu ile inaktivasyonu difteri toksini(80) veya *Pseudomonas aeruginosa* (81) gibi bakterilerin ekzotoksinleri aracılığıyla olur. Daha sık olarak eEF2 Thr56 rezidülerinden Elongasyon faktör-2 kinaz (eEF-2K) tarafından fosforile edilerek inaktive edilir (82). eEF-2K, Ca^{+2} ve kalmodülin bağımlı bir kinazdır ve hücre içi Ca^{+2} seviyesi bu inaktivasyonda önemlidir (83).

eEF2 ve eEF-2K ilişkisi normal fizyolojik koşullarda açlık ve hipoksi gibi hücre sel metabolik stress durumlarında önem kazanır; bu tür stres altındaki hücrede AMP ile aktive edilen kinaz (AMPK) aktive olur, AMPK ise eEF-2K'yi aktive eder (84). Aktive eEF-2K, eEF2'yi fosforile ederek inaktive eder ve nihai olarak protein sentezi durdurulur. Büyüme faktörleri ve besinler eEF-2K inhibisyonu sonucu eEF2 aktivitesinde devamlılık ve nihayetinde protein sentezinde ilerlemeye yol açarlar. Açlık, hipoksi ve oksidatif stres durumlarında eEF-2K aktivitesi uyarılır ve eEF2 fosforilasyonu ile inhibisyonu sonucu protein sentezi durur. Bu fizyolojik kontrolde bozulma tahmin edilebileceği gibi hastalıkta bir faktör olacaktır (Şekil 2.1).

eEF-2K geni 16p12.2'de lokalizedir ve 18 ekzon içerir. 5 farklı transkript kodlar, eEF-2K-001 7388 bp uzunluğundadır ve 725 aminoasit rezidüsünden oluşur. eEF-2K-002 ise non-sense atıktır. Diğer üç transcript (eEF-2K-003, -004, -005) protein ürünü vermez. Gen ürünü olan eEF-2K proteini Ca^{+2} /kalmodülin bağımlı bir alfa kinazdır.

eEF-2K birçok insan kanserinde artmış olarak bulunmuştur. İlk olarak 1994'te Cheng ve arkadaşları, sıçan glioblastom doku örneklerinde ve C6 hücre hatlarında artmış eEF-2K aktivitesini göstermişlerdir (85). 1999 yılında ise insan meme kanserinde Parmer ve arkadaşları meme tümör örneklerinde çevre meme dokularına kıyasla eEF-2K aktivitesinde artma saptamıştır (86). Bunların dışında Tekedereli ve arkadaşları meme kanseri hücre hatlarında ve ortotopik fare modellerinde *in-vivo* olarak eEF-2K'nin selektif inhibisyonunun tümör gelişimini inhibe ettiğini ve apoptozu uyardığını göstermişlerdir (87). eEF-2K'nin pro-tümörijenik proteinler ve yolaklar olan siklin D1, c-Myc, c-Src/FAK ve Akt'ın up-regülasyonu ile ilişkisine işaret edilmiştir. Bu çalışmada eEF-2K siRNA kullanılarak eEF-2K blokajının triple negatif meme kanseri hücre hatlarında siklin D1 ve c-Myc'de azalma ve p27'de artmaya yol açtığı gösterilmiştir. En son olarak Ashour ve arkadaşlarının çalışmasında pankreas tümörü hücre hatlarında eEF-2K aktivitesinin varlığını gösterildi ve eEF-2K'nin Rottlerin ve eEF-2K siRNA kullanarak inhibisyonu sonucu apoptoza gidişin arttığı bildirilmiştir (88).



Şekil 2.1. Normal dokularda ve tümörlerde eEF-2K'nin rolüne ilişkin şematik anlatım (89).

Henüz eEF-2K'nin herhangi bir hematolojik malignenside eksprese olduğuna dair literatürde bir yayın bulunmamaktadır. Yalnızca insan promyelositik lösemi hücre hattı olan HL-60 hücrelerinde eEF-2K aktivitesinin andiferansiye hücrelerde daha yüksek olduğu ve diferansiasyon ile miktarının azaldığı belirtilmiştir (90).

MHL'de siklin D1'in patogenetik önemi gözönüne alındığında siklin D1 ilişkili mekanizmaların ayrıntılı tanımlanması gerektiği açıktır. Transgenik fare modellerinde sadece *IGH/CCND1* translokasyonunun lenfomagenez için yeterli olmadığı bildirilmiştir. Lenfoma gelişimi için

MYC gibi ilave genetik anomalilerin gerekli olduğu saptanmıştır. Bu nedenle Tekedereli ve arkadaşlarının çalışmasında (87) meme kanseri hücre hatlarında gösterdikleri eEF-2K ekspresyon blokajı ile siklin D1 ve c-Myc'de azalma verisinin, MHL patogenezi açısından, eEF-2K ekspresyonu varlığında anlamlı olabileceği düşünülerek bu çalışma planlanmıştır.

3. MATERYAL METOD

3.1. DENEYSEL TASARIM

- 1- Mantle hücreli lenfomada eEF-2K ekspresyonunun araştırılması
 - a. İmmünohistokimyasal olarak MHL hasta örneklerinde eEF-2K ekspresyonunun değerlendirilmesi
 - b. Mantle hücreli lenfoma hücre hatlarında eEF-2K bazal ekspresyonunun Western blot yöntemi ile gösterilmesi
- 2- Mantle hücreli lenfoma hücre hatlarında Rottlerin kullanılarak eEF-2K ekspresyon blokajı deneyleri ile hücre sağkalımının araştırılması
- 3- eEF-2K ekspresyon blokajı (Rottlerin ve eEF-2K siRNA kullanarak) ile ilişkili protein ekspresyonlarının Western blot yöntemi ile değerlendirilmesi (siklin D1, c-Myc, apoptoz ve otofaji ilişkili proteinler)

3.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde 2000-2013 yılları arasında tanı almış MHL vakaları sistemden taranarak saptandı. Bulunan toplam 79 hasta içerisinden parafin blokları mevcut olan ve teknik olarak yeterli bulunan vakalar (39 hasta) çalışmaya dahil edildi. Tanı teyitleri yapıldıktan sonra 4 µm kalınlıkta boyasız kesitler hazırlandı. Her boyama seansı için ayrı ayrı pozitif kontrol olarak prostatik adenokarsinom ve negatif kontrol olarak normal tonsil dokularına ait kesitler hazırlandı.

İmmünohistokimyasal boyama için eEF-2K antikorunu Teksas Üniversitesi MD Anderson Kanseri Araştırma Merkezi Deneysel Tedavi Araştırmaları Bölümü'nden Dr. Bülent Özpolat tarafından temin edildi.

İmmünohistokimyasal boyama işlemi otomatize cihazda gerçekleştirildi (Roche, VENTANA Benchmark® XT). Seçilen parafin bloklardan hazırlanan 4 µm kalınlıktaki kesitler polarize lamalar üzerine alındı. Cihazda otomatize olarak sırasıyla deparafinizasyon, ön hazırlama işlemleri, primer antikor ile inkübasyon, amplifikasyon, Hematoksilen ile karşıt boyama ve Bluing ajanı ile boyama safhaları uygulandı. Ön hazırlama safhasında cihazın üretici firmasına ait CC1 EDTA solüsyonu kullanıldı ve 1 saat uygulama yapıldı. Primer antikor 1:70 oranında dilüe edilerek 2 saat süresince uygulandı. Deteksiyon kiti olarak iVIEW™ DAB Detection Kit (Ventana, Tuscon, AZ, USA) kullanıldı.

İmmünohistokimyasal çalışmalar sonrası tüm deneyler Teksas Üniversitesi MD Anderson Kanseri Araştırma Merkezi Deneysel Tedavi Araştırmaları Bölümü Lopez-Berestein Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.3. MANTLE HÜCRELİ LENFOMA HÜCRE HATLARI

Tüm hücreler Dr. Hesham Amin ve Dr. Rhon Chen tarafından sağlandı. 4 çeşit MHL hücresi kullanıldı. JeKo-1 hücreleri RPMI + %10 FBS, Granta-519 hücreleri DMEM + %20 FBS, Mino ve SP53 hücreleri RPMI + %20 FBS medyumları kullanılarak kültüre edildi. Tüm medyumlara 100 U/mL Penisilin ve Streptomisin eklendi. Hücreler 37°C'de %5 CO₂/%95 hava içeren nemlendirilmiş ortamda yetiştirildi ve 4 ila 15. pasajlar arasında deneylere katıldı.

3.4. HÜCRE PROLİFERASYON DENEYLERİ

Hücre canlılığı ve/veya proliferasyonu MTS (Promega, Madison, WI, ABD) yöntemi ile değerlendirildi. Hücreler hemositometre ile sayıldı ve Tripan mavisi ile canlı hücreler gözlendi. Canlı hücreler 96 gözlü plate'lere 5×10^3 hücre/göz olacak şekilde ekildi. Rottlerin ticari olarak temin edildi (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, ABD), DMSO içinde çözüldü ve hücrelere direk olarak 1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 7,5 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlarda eklendi. Kontrol hücreleri sadece DMSO ile muamele edildi. Rottlerin ile 72 saat inkübasyon sonrası hücrelere MTS (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-5-(3-karboksi-metoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum) ve PMS (fenazin metosülfat)(20:1 oranında solüsyon) eklenerek 37°C'de 2-3 saat inkübe edildi. Canlı çoğalan hücreler 490 nm dalga boyunda absorbansları saptanarak değerlendirildi. Tüm deneyler 3 kez tekrarlandı ve sonuçlar ortalama absorbans değeri ± 1 standart sapma olarak kaydedildi.

3.5. WESTERN BLOT ANALİZLERİ

Hücreler 25 cm² kültür flaklarında ekildi (5×10^5 hücre). Bazal durumda ve/veya Rottlerin uygulaması sonrası hücreler toplandı, santrifüje edildi, soğuk PBS ile yıkandı ve 4 °C'de lizat tamponunda muamele edilerek hücre lizatları elde edildi. Takiben 13000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant fraksiyonları toplandı. Her örnek için total protein konsantrasyonu protein ölçüm kiti (Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) kullanılarak saptandı ve Western blot işlemi gerçekleştirildi. Her örnek için standart olarak 40 μ g total protein içerecek şekilde yükleme işlemi gerçekleştirildi, SDS-PAGE işlemine tabi tutuldu ve PVDF (poliviniliden diflorid) membranlara elektro-transfer

edildi. Membranlar blokaj tamponu (TBS-Tween 20) solüsyonunda çözülmüş %5 süt tozu içinde Triton X-100) ile 60 dakika bloke edildi. TBS-T ile yıkamalar sonrası membranlar 4 °C'de bir gece TBS-T solüsyonunda çözülmüş %5 süt tozu içinde primer antikolarlar eEF-2K, siklin D1, PARP, kaspaz-9 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, ABD) ve PKC- δ , LC3 (Santa Cruz, CA, ABD) ile inkübe edildi. TBS-T ile yıkama sonrası membranlar horseradish peroksidaz konjuge fare ve tavşan sekonder antikoları (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, ABD) ile inkübe edildi. Yükleme kontrolü amaçlı olarak fare anti- β -aktin primer ve maymun anti-fare sekonder antikoları (Sigma Chemical, St. Louis, MO, ABD) kullanılarak β -aktin ekspresyonları saptandı. Chemi-glow (Alpha Innotech, San Leandro, CA, ABD) saptama re ajanları kullanılarak kimyasal ışım a ölçümleri FluorChem 8900 görüntüleyicide saptama yapıldı.

3.6. siRNA İle TRANSFEKSİYON

eEF-2K (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) hedefleyen siRNA, siRNA-tasarlama yazılımı (Qiagen) kullanılarak tasarlandı: 50-GCCAACCAGUACUACCAAA-30. Kontrol "non-silencing" siRNA olarak 50-AAUUCUCCGAACGUGUCACGU-30 kullanıldı.

JeKo-1 ve Mino hücreleri 1,5 μ g eEF-2K siRNA ile Nucleofector 2b (Lonza, Gaithersburg, MD, USA) cihazında Cell Line Nucleofector Kit V ticari solüsyonu kullanılarak elektroporasyon esasıyla transfekte edildi. JeKo-1 hücreleri için T-01 programı ve Mino hücreleri için T-02 programı kullanıldı.

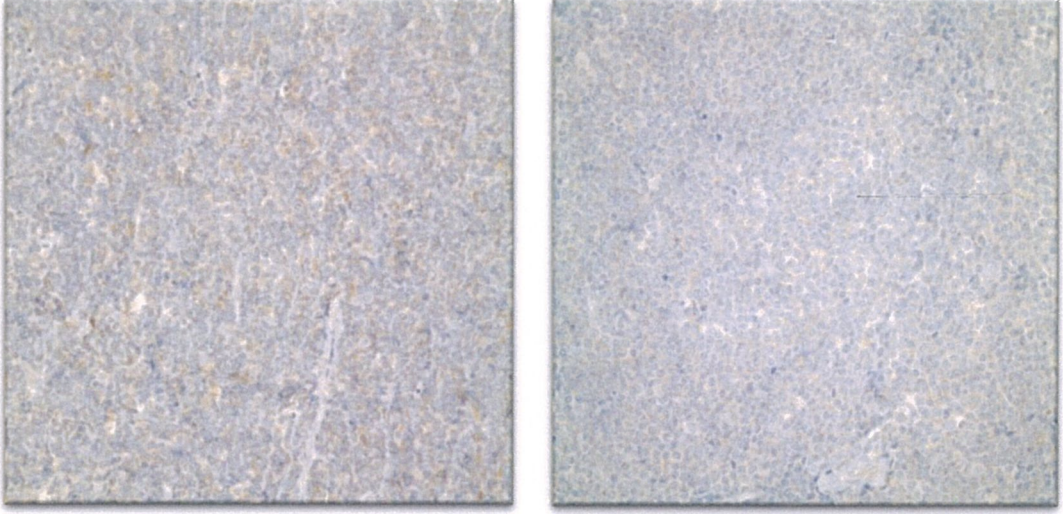
4. BULGULAR

4.1. MANTLE HÜCRELİ LENFOMA HASTALARINA AİT KESİTLERDE eEF-2K EKSPRESYONUNUN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ANALİZİ

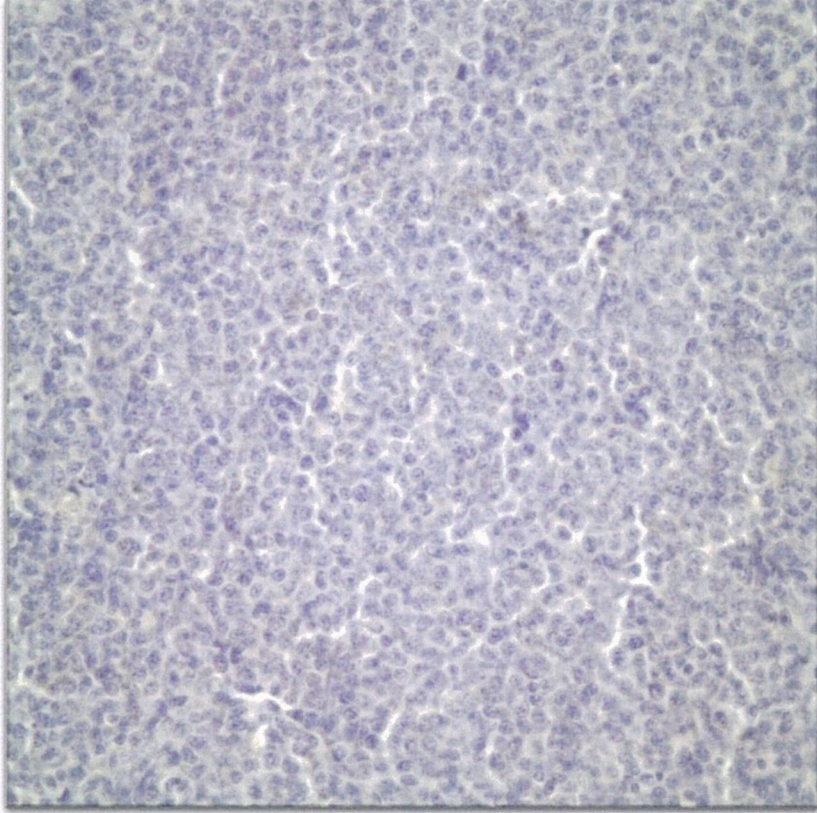
Çalışmaya dahil edilen 39 hastaya ait parafin bloklardan hazırlanan kesitlerde anti-eEF-2K antikoruna ile gerçekleştirilen immünohistokimyasal çalışmalarda 25 vaka (25/39, %64,1) eEF-2K antikoruna ile immünoreaktif bulundu. Reaksiyon gözlenen tüm vakalarda boyanma sitoplazmik olarak saptandı. Boyanma dereceleri değişken olarak saptandı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Mantle hücreli lenfoma vakalarında immünohistokimyasal yöntemle saptanan kuvvetli eEF-2K ekspresyonu.



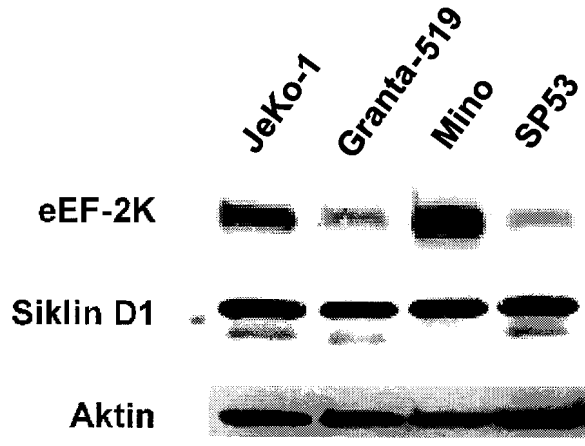
Şekil 4.2. Mantle hücreli lenfoma vakalarında immünohistokimyasal yöntemle saptanan orta şiddette eEF-2K ekspresyonu.



Şekil 4.3. Mantle hücreli lenfoma vakalarında immünohistokimyasal yöntemle eEF-2K ekspresyonu için negatif olan bir olgu.

4.2. MHL HÜCRE HATLARINDA WESTERN BLOT YÖNTEMİYLE eEF-2K EKSPRESYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Western blot yöntemiyle MHL hücre hatları olan JeKo-1, Granta-519, Mino ve SP53'te eEF-2K ekspresyonu değerlendirildi. Şekil 4.4'te görüldüğü gibi özellikle JeKo-1 ve Mino hücre hatlarında yüksek düzeyde eEF-2K ekspresyonu saptandı.

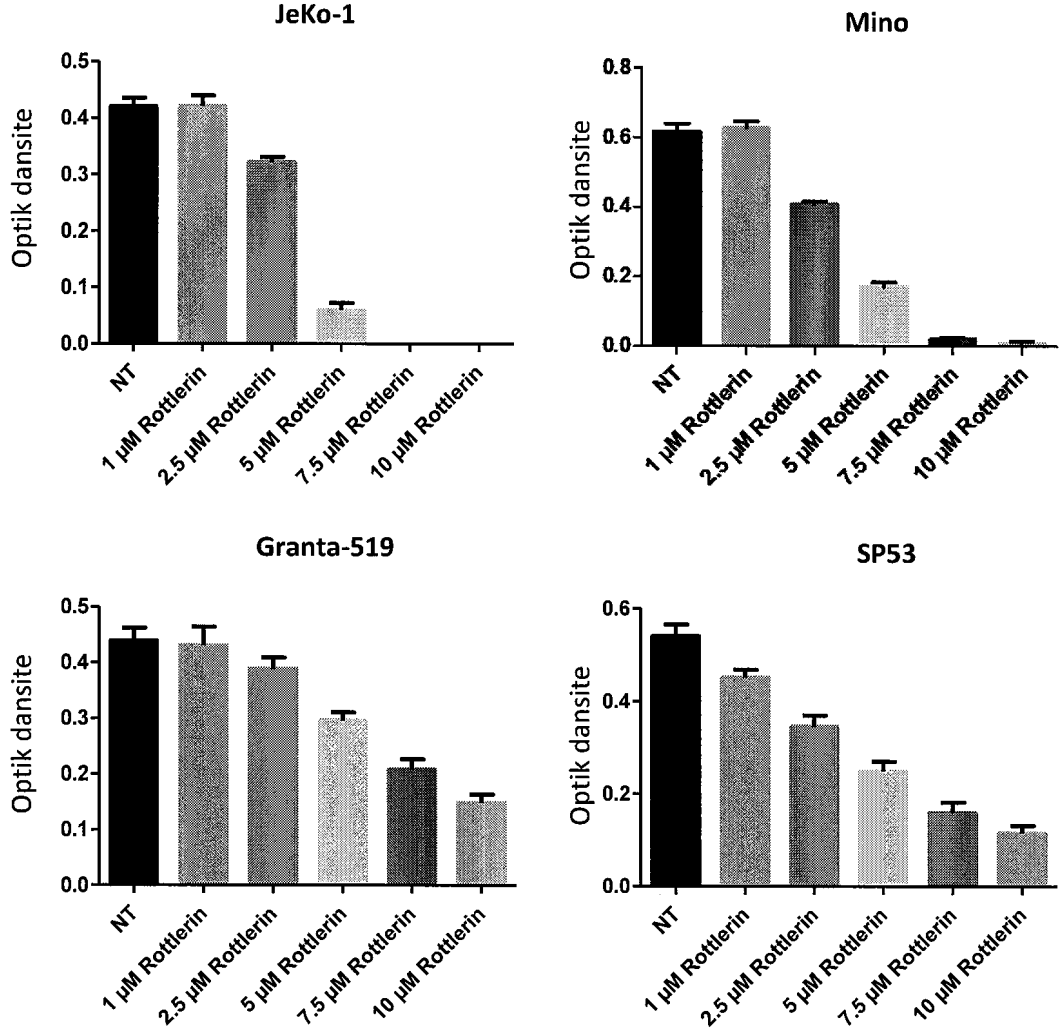


Şekil 4.4. MHL hücre hatlarında Western blot yöntemiyle saptanan eEF-2K ekspresyonu. Ekspresyon JeKo-1 ve Mino hücrelerinde belirgindir.

4.3. ROTTLERİN UYGULAMASI İLE MHL HÜCRE HATLARINDA HÜCRE PROLİFERASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Rottlerin ile uygulama sonrası hücre proliferasyonundaki inhibisyonu değerlendirmek amacıyla yapılan MTS yöntemi çalışmalarında farklı Rottlerin dozlarında 72 saat sonrasında Rottlerin uygulanmayan hücrelere kıyasla büyümelerinin log fazındaki 4 hücre hattında belirgin proliferasyon inhibisyonu gözlemlendi. Proliferasyon

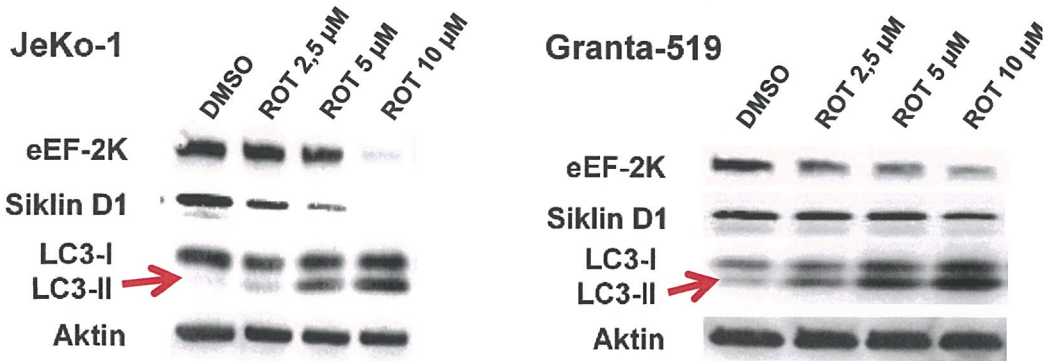
inhibisyonu özellikle JeKo-1 ve Mino hücrelerinde belirgin olarak saptandı (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Rottlerin uygulaması ile JeKo-1, Mino, Granta-519 ve SP53 hücre hatlarında 72 saat zaman noktasında gözlenen proliferasyon inhibisyonu. İnhibisyon özellikle JeKo-1 ve Mino hücrelerinde belirgindir.

4.4. ROTTLERİN UYGULAMASI SONRASINDA WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE JEKO-1 VE GRANTA-519 HÜCRELERİNDE eEF-2K, SİKLİN D1 EKSPRESYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ VE OTOFAJİ İLE İLİŞKİSİNİN GÖSTERİLMESİ

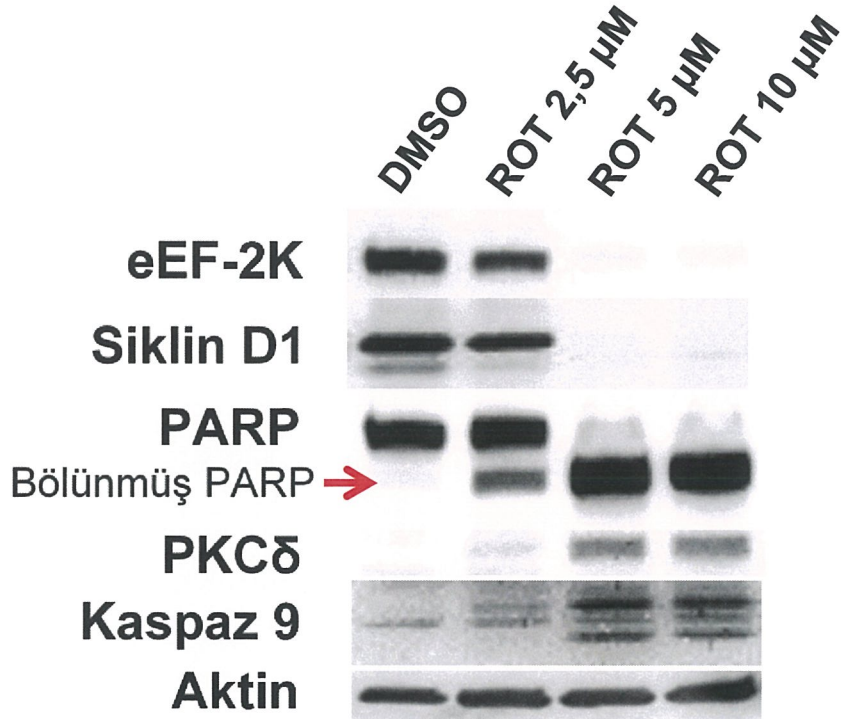
Rottlerin uygulamasının eEF-2K ve siklin D1 ekspresyonları üzerinde etkisini göstermek amacıyla gerçekleştirilen Western blot deneylerinde; artan dozlarda uygulanan Rottlerin ile JeKo-1 ve Granta-519 hücre hatlarında 48 saat zaman noktasında eEF-2K ve siklin D1 ekspresyonunda azalma saptanmıştır. Ayrıca değerlendirilen LC3 proteininde LC3-II fraksiyonunda artış ile artan Rottlerin dozlarında hücrelerde otofaji indüksiyonu olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. JeKo-1 ve Granta-519 hücrelerinde artan Rottlerin dozları ile eEF-2K ve siklin D1 ekspresyonlarında azalma izlenmiştir. Her iki hücrede de Rottlerin uygulaması eEF-2K inhibisyonuna paralel olarak otofaji indüksiyonuna yol açmıştır.

4.5. ROTTLERİN UYGULAMASI SONRASINDA WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE JEKO-1 HÜCRELERİNDE APOPTOZ İNDÜKSİYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

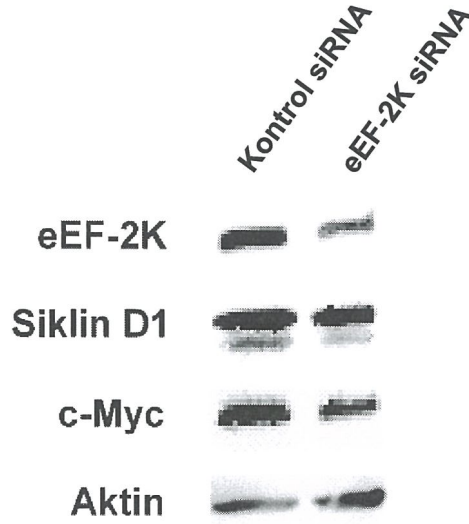
JeKo-1 hücrelerinde Rottlerin uygulaması ile 72 saat zaman noktasında eEF-2K inhibisyonu, PARP bölünmesi ve kaspaz 9 artışı saptanmıştır. Bu bulguların Rottlerin'e bağlı olabilecek PKC δ inhibisyonu sonucu gerçekleşmediğini göstermek için değerlendirilen PKC δ bandında gözlenen ekspresyon artışı, eEF-2K inhibisyonu ve apoptotik aktivite artışının PKC δ bağımsız olduğunu göstermiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. JeKo-1 hücrelerinde 48 saat zaman noktasında Rottlerin uygulaması ile eEF-2K ve siklin D1 ekspresyonunda inhibisyon gözlenmektedir. Ayrıca LC3-II fraksiyonunda belirgin olarak izlenen artış Rottlerin ilişkili olarak otofaji indüksiyonuna işaret etmiştir.

4.6. JEKO-1 HÜCRE HATTINDA siRNA ile eEF-2K İNHİBİSYONU SONRASI SİKLİN D1 ve c-MYC EKSPRESYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

eEF-2K inhibisyonu ile siklin D1 ve c-Myc arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için eEF-2K siRNA kullanılarak gerçekleştirilen RNA interferansı deneyinde, JeKo-1 hücrelerinde eEF-2K inhibisyonu ile siklin D1 ekspresyonu ve c-Myc ekspresyonunda inhibisyon saptanmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. RNA interferansı yöntemiyle 48 saat zaman noktasında JeKo-1 hücrelerinde eEF-2K siRNA kullanılarak gerçekleştirilen RNA interferansı deneyinde siklin D1'de ve c-Myc'de ekspresyon inhibisyonu gözlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Mantle hücreli lenfoma Kiel sınıflamasında diğer sitolojik olarak düşük dereceli lenfomalar ile birlikte sınıflandırılmakla birlikte, medyan genel sağkalımın 3-4 yıl civarında olduğu agresif bir B lenfoproliferatif hastalıktır. Mevcut tedavi protokolleri ile vakaların %35'inde komplet remisyona elde edilmektedir; fakat hastalısız sağkalım periyodu kısadır ve çok az sayıda hasta uzun dönem remisyona şansı bulabilmektedir. Relapstan sonra hastalarda aylar içerisinde lenf nodlarında büyüme ve kemoterapiye rezistans gelişimi ile karakterize görece yavaş bir seyir görülebilmekle birlikte bunu nihai bir akselere faza dönüşüm izler.

Hastalığın en önemli genetik bulgusu artmış siklin D1 ekspresyonu ve sonucunda hücre siklus kontrolünde deregülasyona yol açan 11q14 translokasyonudur. MHL ayrıca en fazla sayıda sekonder kromozomal alterasyonların eşlik ettiği lenfoma tipi olup medyan karyotipik anomali sayısı 4 olarak saptanmıştır. Bu sekonder karyotipik ve diğer (birçok sinyal yolağını da ilgilendiren) genetik olaylar sıklıkla DNA hasar cevap mekanizmalarını da bozarak siklin D1'in onkojenik potansiyeline katkıda bulunur.

Mantle hücreli lenfomada son 2 dekatta tedavi seçenekleri büyük gelişim göstermiştir. Otolog kök hücre nakli ile birlikte yüksek doz kemoterapi, yüksek doz sitarabin ve rituksimabın seçenekler arasına girmesiyle en azından genç hastalar için klinik sonuçlarda iyileşme sağlanmıştır. Ancak hastalığın görülme sıklığındaki görece düşük insidans, yeni tedavi olanaklarının araştırılmasında klinik temelli randomize çalışmalar yanı sıra patogenetik mekanizmaları tanımlamayı hedefleyen ve hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesinde hücre hatları ve hayvan temelli deneysel araştırmaların da önemini arttırmaktadır.

eEF-2K son yıllarda birçok insan kanserinde aktivitesinin gösterilmesiyle dikkatlerin üzerine çevrilmeye başladığı bir molekül olmuştur. İnsan glioblastoma hücre hatlarında eEF-2K aktivitesinin susturulması besin yoksunluğuna cevap olarak otofajik kapasitede azalma ile sonuçlanmıştır ve eEF-2K'ı kanser hücrelerinin hayatta kalma yeteneklerini arttıran bir yaşam yanlısı faktör olarak gündeme almıştır (91). Daha güncel olarak Tekedereli ve arkadaşları meme kanseri hücre hatlarında eEF-2K aktivitesindeki artışı göstermiştir. Bu çalışmada eEF-2K aktivitesinin RNA interferansı yöntemleriyle susturulması büyüme, klonajenisite, invazyon ve migrasyonda azalma ile sonuçlanmıştır. Aynı çalışmada lipozomal siRNA kullanılarak gerçekleştirilen in-vivo eEF-2K inhibisyonu ile ortotopik zenograft triple negatif meme kanseri fare modelinde tümör büyümesinin inhibisyonu ve apoptoz indüksiyonu saptanmıştır (87). Ashour ve arkadaşları ise pankreas kanseri hücre hatlarında artmış eEF-2K ekspresyonunu saptamışlardır ve Rottlerin ile eEF-2K siRNA kullanılarak eEF-2K inhibisyonunun intrinsek, ekstrinsek ve AIF-bağımlı apoptozis gelişimini indüklediğini göstermiştir (88).

Çalışmamızda MHL'de ilk defa eEF-2K ekspresyonu varlığı gösterilmiş olup, bu bulgu *in-vitro* olarak MHL hücre hatları olan JeKo-1, Mino, Granta-519 ve SP53'te Western blot yöntemi ile ve *in-vivo* olarak da MHL hastalarına ait tümör örneklerinde immünohistokimyasal yöntemle gösterilmiştir. MHL hasta örneklerinde yapılan immünohistokimyasal çalışmada değerlendirilen 39 hastanın 25'inde (%64,1) anlamlı ekspresyon varlığı saptanmıştır. Boyanma yoğunluklarının daha ziyade zayıf veya orta şiddette olması, kullanılan antikor miktarının sınırlılığı nedeniyle optimum konsantrasyon değerine ulaşılamamış olmasıyla açıklanabilir. Çalışmamızda immünohistokimyasal olarak doku kesitlerinde pozitif reaksiyon olarak

değerlendirilen sonuca 1:70 dilüsyon oranında ulaşılmıştır. Boyanma kalitesi kullanılan ticari antikorun niteliğinden de etkilenmiş olabilir. Öte yandan çalışmaya dahil edilen vakaların bir kısmı bölümümüze tanısal konsültasyon amacıyla gönderilmiş vakalar olup bu örneklerin bazılarında yetersiz doku tespit-takip kalitesi nedeniyle yalancı negatiflik oranının yüksek olduğunu düşünmekteyiz. MHL hücre hatlarında ise özellikle JeKo-1 ve Mino hücrelerinde belirgin olmak üzere 4 hücrede de belirgin eEF-2K ekspresyonu varlığını saptadık.

Rottlerin çeşitli kanser tiplerinde antiproliferatif etkisi olduğu bilinmektedir.(92) Bu etkiler daha ziyade apoptoz ve otofaji inhibisyonu ile ilişkilidir.(92) Erken çalışmalarda Rottlerin ilişkili pro-apoptotik etkilerin PKC δ bağımlı mekanizmalar ile ilişkili olduğu düşünülmekteyse de, bu etkilerin Rottlerin ilişkili eEF-2K aracılı mekanizmalar ile sıkı ilişkisi olduğu gösterilmiştir (88). Ashour ve arkadaşları pankreatik kanser hücre hatlarında Rottlerin ve eEF-2K siRNA aracılı eEF-2K down-regülasyonunun apoptozu indüklediğini, ayrıca lentiviral vektörler aracılığı ile sağlanan eEF-2K arttırılmış ekspresyonunun hücreleri apoptozdan koruduğunu göstermiştir.(88) Çalışmamızda biz de MHL hücre hatlarında Rottlerin aracılı eEF-2K inhibisyonu ve MTS çalışmalarında her 4 MHL hücre hattında doz bağımlı olarak hücre proliferasyonu inhibisyonu gözledik. Hücre proliferasyon inhibisyonu JeKo-1 ve Mino hücrelerinde daha düşük konsantrasyon değerlerinde gözlenmiş olup, bu bulgu söz konusu hücre hatlarının köken aldığı hastalarda agresif klinik hastalık tabiatıyla belli oranda ilişkilendirilebilir. Bilmekteyiz ki JeKo-1 hücre hattı MHL'nin agresif bir morfolojik alt tipi olan pleomorfik tipine sahip bir hastadan oluşturulmuştur (93, 94).

JeKo-1 ve Mino hücre hatlarında Granta-519 ve SP53'e kıyasla saptanan gerek daha belirgin eEF-2K ekspresyonu ve gerekse Rottlerin ile indüklenen hücre proliferasyonunda daha belirgin azalma dikkate

değer bulunmuştur. Bu iki bulgu en azından bu iki hücrenin hayatta kalma mekanizmaları üzerinde eEF-2K ilişkili yolların ön planda olduğunu akla getirmektedir.

MHL'de transgenik fare modellerinde tek başına *IGH/CCND1* translokasyonu spontan lenfoma gelişimi için yeterli bulunmamıştır. Bu çalışmalarda başlatılabilen lenfomalarda, bu translokasyon dışında *MYC* gibi transforme edici ek moleküler olayların varlığı gerekli olmuştur (95, 96). Bununla birlikte başka çalışmalarda transgenik farelerde "constitutive" nükleer siklin D1 ekspresyonu B lenfoma gelişimini başlatabilmiştir, ancak bu lenfomalar patolojik olarak MHL ile özdeş bulunmamıştır (97). Çalışmamızda Rottlerin uygulaması ile doz bağımlı olarak JeKo-1 ve Granta-519 hücre hatlarında eEF-2K baskılanması yanı sıra JeKo-1 hücrelerinde daha belirgin olmak üzere siklin D1 baskılanması saptadık. eEF-2K siRNA kullanarak gerçekleştirdiğimiz RNA interferans deneyinde ise eEF-2K blokajı JeKo-1 hücrelerinde c-Myc down-regülasyonuna ve görece olarak daha az oranda siklin D1 down-regülasyonuna yol açmıştır. Bu bulgu Tekedereli ve arkadaşlarının triple negatif meme kanseri hücre hatlarında eEF-2K siRNA kullanarak elde ettiği (bizim çalışmamıza da çıkış noktası oluşturan) siklin D1 ve c-Myc baskılanması ile paraleldir (87). MHL'de *MYC* genini ilgilendiren translokasyon ve amplifikasyonlar gibi kromozomal aberasyonlar blastik morfoloji ve agresif klinik gidiş ile ilişkili bulunmuştur (60, 61). Chen ve arkadaşları, siklin D1 siRNA kullanarak gerçekleştirdikleri gen susturulması deneylerinde, siklin D1 inhibisyonu ile JeKo-1 ve Granta-519 hücrelerinde hücre proliferasyonunda ve büyümesinde apoptoz artışı *yapmaksızın* orta derecede azalma sağlamış olup siklin D2 veya siklin D3'de artış ile sonuçlanmıştır (50, 98). Fakat diğer iki çalışmada ise siRNA ile siklin D1 blokajı büyüme inhibisyonu, hücre siklusu duraklaması ve apoptoz indüksiyonu ile sonuçlanmış (99) ve MHL

hücrelerinin doksorubisin ve etoposid'e duyarlılığında artışa yol açmıştır (100). Chen kendi çalışmasının sonuçlarına dayanarak tek başına siklin D1'in uygun bir tedavi hedefi teşkil etmeyebileceğini belirtmiştir. Bu bağlamda bizim çalışmamızda MHL hücre hatlarında saptamış olduğumuz Rottlerin aracılı eEF-2K ve siklin D1 inhibisyonu ile eEF-2K siRNA aracılı gen susturulması deneyinde gözlenen c-Myc down-regülasyonu birlikte değerlendirildiğinde geleceğe yönelik terapötik anlam taşıyor olabilir.

Çalışmamızda JeKo-1 ve Granta-519 hücrelerinde Rottlerin ile eEF-2K inhibisyonu bir otofaji bulgusu olarak LC3-II fraksiyonunda artış ile sonuçlanmıştır. Bir diğer deneyde ise, JeKo-1 hücrelerinde Rottlerin ilişkili olarak kaspaz 9 ve PARP bölünmesi ile karakterize mitokondriyal yolak apoptoz aktivasyonu saptadık. Bu bulguların artan Rottlerin dozları ile paralel olarak PKC δ dozlarının değişmemesi nedeniyle Rottlerin'in olası PKC δ inhibisyonu ile ilişkisi olmadığını ortaya koymaktadır. Ashour ve arkadaşlarının çalışmasında (88) da pankreas kanseri hücre hatlarında Rottlerin kullanılarak eEF-2K inhibisyonu saptanmış olup; RT-PZR çalışmasında eEF-2K mRNA seviyesinde de azalma gösterilmesiyle bu inhibisyonun transkripsiyonel seviyede gerçekleştiği anlaşılmaktadır. Aynı çalışmada Rottlerin kullanılarak eEF-2K inhibisyonu ile ekstrensek ve intrensek apoptoz aktivasyonu gözlenmiştir.

6. SONUÇ

Bulgularımız değerlendirildiğinde MHL'de artmış eEF-2K ekspresyonuna işaret etmektedir. eEF-2K ekspresyonu MHL hücrelerinde sağkalım avantajı sağlamaktadır ve ekspresyonun Rottlerin veya gen susturulması yöntemleriyle baskılanması hücrelerde otofajik/apoptotik yolları aktive etmektedir. Dahası eEF-2K ekspresyonu siklin D1 ve c-Myc ekspresyonu ile ilişkilidir.

Mevcut tedavi yöntemleri ile hala tam kür şansı bulunmayan bir hastalık olan MHL'de neoplastik hücrelere sağkalım avantajı sağlayan genetik ve/veya epigenetik değişikliklerin kapsamlı olarak kavranması, konvansiyonel tedavilere ilave olarak hedefe yönelik yeni tedavi modalitelerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır. Bu anlamda çalışmamızda literatürde ilk kez göstermiş olduğumuz MHL lenfoma ile eEF-2K ilişkisi terapötik değer taşımaktadır. Yeni tedavi modalitelerinin gelişmesine ışık tutabilmesi anlamında bu ve benzer patogenetik mekanizmaların özellikle in-vivo çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Steven H. Swerdlow EC, Nancy Lee Harris, Elaine S. Jaffe, Stefano A. Pileri, Herald Stein, Jorgen Thiele, James W. Vardiman. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2008.
2. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011;117:5019-5032.
3. Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood*. 2005;106:4315-4321.
4. Smedby KE, Hjalgrim H. Epidemiology and etiology of mantle cell lymphoma and other non-Hodgkin lymphoma subtypes. *Seminars in cancer biology*. 2011;21:293-298.
5. Sant M, Allemani C, Tereanu C, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood*. 2010;116:3724-3734.
6. Zhou Y, Wang H, Fang W, et al. Incidence trends of mantle cell lymphoma in the United States between 1992 and 2004. *Cancer*. 2008;113:791-798.
7. Wang Y, Ma S. Racial differences in mantle cell lymphoma in the United States. *BMC cancer*. 2014;14:764.
8. Ghielmini M, Zucca E. How I treat mantle cell lymphoma. *Blood*. 2009;114:1469-1476.
9. Campo E, Raffeld M, Jaffe ES. Mantle-cell lymphoma. *Seminars in hematology*. 1999;36:115-127.

10. Swerdlow SH, Williams ME. From centrocytic to mantle cell lymphoma: a clinicopathologic and molecular review of 3 decades. *Human pathology*. 2002;33:7-20.
11. Ferrer A, Salaverria I, Bosch F, et al. Leukemic involvement is a common feature in mantle cell lymphoma. *Cancer*. 2007;109:2473-2480.
12. Hashimoto Y, Nakamura N, Kuze T, et al. Multiple lymphomatous polyposis of the gastrointestinal tract is a heterogenous group that includes mantle cell lymphoma and follicular lymphoma: analysis of somatic mutation of immunoglobulin heavy chain gene variable region. *Human pathology*. 1999;30:581-587.
13. Kodama T, Ohshima K, Nomura K, et al. Lymphomatous polyposis of the gastrointestinal tract, including mantle cell lymphoma, follicular lymphoma and mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Histopathology*. 2005;47:467-478.
14. Moynihan MJ, Bast MA, Chan WC, et al. Lymphomatous polyposis. A neoplasm of either follicular mantle or germinal center cell origin. *The American journal of surgical pathology*. 1996;20:442-452.
15. Brody J, Advani R. Treatment of mantle cell lymphoma: current approach and future directions. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2006;58:257-265.
16. Harel S, Delarue R, Ribrag V, et al. Treatment of younger patients with mantle cell lymphoma. *Seminars in hematology*. 2011;48:194-207.
17. Chandran R, Gardiner SK, Simon M, et al. Survival trends in mantle cell lymphoma in the United States over 16 years 1992-2007. *Leukemia & lymphoma*. 2012;53:1488-1493.
18. Orchard J, Garand R, Davis Z, et al. A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood*. 2003;101:4975-4981.

19. Carvajal-Cuenca A, Sua LF, Silva NM, et al. In situ mantle cell lymphoma: clinical implications of an incidental finding with indolent clinical behavior. *Haematologica*. 2012;97:270-278.
20. Schulz H, Bohlius JF, Trelle S, et al. Immunochemotherapy with rituximab and overall survival in patients with indolent or mantle cell lymphoma: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2007;99:706-714.
21. Howard OM, Gribben JG, Neuberg DS, et al. Rituximab and CHOP induction therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma: molecular complete responses are not predictive of progression-free survival. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002;20:1288-1294.
22. Cortelazzo S, Ponzoni M, Ferreri AJ, et al. Mantle cell lymphoma. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2012;82:78-101.
23. Dreyling M, Ferrero S, Hermine O. How to manage mantle cell lymphoma. *Leukemia*. 2014;28:2117-2130.
24. Herrmann A, Hoster E, Zwingers T, et al. Improvement of overall survival in advanced stage mantle cell lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27:511-518.
25. Klapper W. Histopathology of mantle cell lymphoma. *Seminars in hematology*. 2011;48:148-154.
26. Nodit L, Bahler DW, Jacobs SA, et al. Indolent mantle cell lymphoma with nodal involvement and mutated immunoglobulin heavy chain genes. *Human pathology*. 2003;34:1030-1034.
27. Lecluse Y, Lebailly P, Roulland S, et al. t(11;14)-positive clones can persist over a long period of time in the peripheral blood of healthy individuals. *Leukemia*. 2009;23:1190-1193.

28. Adam P, Schiefer AI, Prill S, et al. Incidence of preclinical manifestations of mantle cell lymphoma and mantle cell lymphoma in situ in reactive lymphoid tissues. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2012;25:1629-1636.
29. Cohen PL, Kurtin PJ, Donovan KA, et al. Bone marrow and peripheral blood involvement in mantle cell lymphoma. *British journal of haematology.* 1998;101:302-310.
30. Burke JS. Lymphoproliferative disorders of the gastrointestinal tract: a review and pragmatic guide to diagnosis. *Archives of pathology & laboratory medicine.* 2011;135:1283-1297.
31. Pott C, Schrader C, Bruggemann M, et al. Blastoid variant of mantle cell lymphoma: late progression from classical mantle cell lymphoma and quantitation of minimal residual disease. *European journal of haematology.* 2005;74:353-358.
32. Tiemann M, Schrader C, Klapper W, et al. Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *British journal of haematology.* 2005;131:29-38.
33. Camacho FI, Garcia JF, Cigudosa JC, et al. Aberrant Bcl6 protein expression in mantle cell lymphoma. *The American journal of surgical pathology.* 2004;28:1051-1056.
34. Gao J, Peterson L, Nelson B, et al. Immunophenotypic variations in mantle cell lymphoma. *American journal of clinical pathology.* 2009;132:699-706.
35. Zanetto U, Dong H, Huang Y, et al. Mantle cell lymphoma with aberrant expression of CD10. *Histopathology.* 2008;53:20-29.

36. Morice WG, Hodnefield JM, Kurtin PJ, et al. An unusual case of leukemic mantle cell lymphoma with a blastoid component showing loss of CD5 and aberrant expression of CD10. *American journal of clinical pathology*. 2004;122:122-127.
37. Gualco G, Weiss LM, Harrington WJ, Jr., et al. BCL6, MUM1, and CD10 expression in mantle cell lymphoma. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry*. 2010;18:103-108.
38. Swerdlow SH, Yang WI, Zukerberg LR, et al. Expression of cyclin D1 protein in centrocytic/mantle cell lymphomas with and without rearrangement of the BCL1/cyclin D1 gene. *Human pathology*. 1995;26:999-1004.
39. Li JY, Gaillard F, Moreau A, et al. Detection of translocation t(11;14)(q13;q32) in mantle cell lymphoma by fluorescence in situ hybridization. *The American journal of pathology*. 1999;154:1449-1452.
40. Remstein ED, Kurtin PJ, Buno I, et al. Diagnostic utility of fluorescence in situ hybridization in mantle-cell lymphoma. *British journal of haematology*. 2000;110:856-862.
41. Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, et al. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer cell*. 2003;3:185-197.
42. Salaverria I, Royo C, Carvajal-Cuenca A, et al. CCND2 rearrangements are the most frequent genetic events in cyclin D1(-) mantle cell lymphoma. *Blood*. 2013;121:1394-1402.
43. Mozos A, Royo C, Hartmann E, et al. SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica*. 2009;94:1555-1562.

44. Ek S, Dictor M, Jerkeman M, et al. Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. *Blood*. 2008;111:800-805.
45. Xu W, Li JY. SOX11 expression in mantle cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma*. 2010;51:1962-1967.
46. Dictor M, Ek S, Sundberg M, et al. Strong lymphoid nuclear expression of SOX11 transcription factor defines lymphoblastic neoplasms, mantle cell lymphoma and Burkitt's lymphoma. *Haematologica*. 2009;94:1563-1568.
47. Lu TX, Li JY, Xu W. The role of SOX11 in mantle cell lymphoma. *Leukemia research*. 2013;37:1412-1419.
48. Perez-Galan P, Dreyling M, Wiestner A. Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood*. 2011;117:26-38.
49. Komatsu H, Iida S, Yamamoto K, et al. A variant chromosome translocation at 11q13 identifying PRAD1/cyclin D1 as the BCL-1 gene. *Blood*. 1994;84:1226-1231.
50. Hasanali Z, Sharma K, Epner E. Flipping the cyclin D1 switch in mantle cell lymphoma. *Best practice & research Clinical haematology*. 2012;25:143-152.
51. Solomon DA, Wang Y, Fox SR, et al. Cyclin D1 splice variants. Differential effects on localization, RB phosphorylation, and cellular transformation. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278:30339-30347.
52. Slotta-Huspenina J, Koch I, de Leval L, et al. The impact of cyclin D1 mRNA isoforms, morphology and p53 in mantle cell lymphoma: p53 alterations and blastoid morphology are strong predictors of a high proliferation index. *Haematologica*. 2012;97:1422-1430.

53. Seto M, Yamamoto K, Iida S, et al. Gene rearrangement and overexpression of PRAD1 in lymphoid malignancy with t(11;14)(q13;q32) translocation. *Oncogene*. 1992;7:1401-1406.
54. Harris AW, Bodrug SE, Warner BJ, et al. Cyclin D1 as the putative bcl-1 oncogene. *Current topics in microbiology and immunology*. 1995;194:347-353.
55. Salaverria I, Zettl A, Bea S, et al. Specific secondary genetic alterations in mantle cell lymphoma provide prognostic information independent of the gene expression-based proliferation signature. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25:1216-1222.
56. Seto M. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma. *Blood*. 2013;121:1249-1250.
57. Au WY, Gascoyne RD, Viswanatha DS, et al. Cytogenetic analysis in mantle cell lymphoma: a review of 214 cases. *Leukemia & lymphoma*. 2002;43:783-791.
58. Espinet B, Salaverria I, Bea S, et al. Incidence and prognostic impact of secondary cytogenetic aberrations in a series of 145 patients with mantle cell lymphoma. *Genes, chromosomes & cancer*. 2010;49:439-451.
59. Ott G, Kalla J, Ott MM, et al. Blastoid variants of mantle cell lymphoma: frequent bcl-1 rearrangements at the major translocation cluster region and tetraploid chromosome clones. *Blood*. 1997;89:1421-1429.
60. Royo C, Salaverria I, Hartmann EM, et al. The complex landscape of genetic alterations in mantle cell lymphoma. *Seminars in cancer biology*. 2011;21:322-334.
61. Vaishampayan UN, Mohamed AN, Dugan MC, et al. Blastic mantle cell lymphoma associated with Burkitt-type translocation and hypodiploidy. *British journal of haematology*. 2001;115:66-68.

62. Hao S, Sanger W, Onciu M, et al. Mantle cell lymphoma with 8q24 chromosomal abnormalities: a report of 5 cases with blastoid features. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2002;15:1266-1272.
63. Oliveira FM, Tone LG, Simoes BP, et al. Blastoid mantle cell lymphoma with t(2;8) (p12;q24). *Leukemia & lymphoma.* 2007;48:2079-2082.
64. Michaux L, Wlodarska I, Theate I, et al. Coexistence of BCL1/CCND1 and CMYC aberrations in blastoid mantle cell lymphoma: a rare finding associated with very poor outcome. *Annals of hematology.* 2004;83:578-583.
65. Pinyol M, Hernandez L, Cazorla M, et al. Deletions and loss of expression of p16INK4a and p21Waf1 genes are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood.* 1997;89:272-280.
66. Hernandez L, Bea S, Pinyol M, et al. CDK4 and MDM2 gene alterations mainly occur in highly proliferative and aggressive mantle cell lymphomas with wild-type INK4a/ARF locus. *Cancer research.* 2005;65:2199-2206.
67. Jares P, Campo E. Advances in the understanding of mantle cell lymphoma. *British journal of haematology.* 2008;142:149-165.
68. Jares P, Colomer D, Campo E. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nature reviews Cancer.* 2007;7:750-762.
69. Camacho E, Hernandez L, Hernandez S, et al. ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances. *Blood.* 2002;99:238-244.

70. Tort F, Hernandez S, Bea S, et al. CHK2-decreased protein expression and infrequent genetic alterations mainly occur in aggressive types of non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 2002;100:4602-4608.
71. Tort F, Hernandez S, Bea S, et al. Checkpoint kinase 1 (CHK1) protein and mRNA expression is downregulated in aggressive variants of human lymphoid neoplasms. *Leukemia*. 2005;19:112-117.
72. Stefancikova L, Moulis M, Fabian P, et al. Loss of the p53 tumor suppressor activity is associated with negative prognosis of mantle cell lymphoma. *International journal of oncology*. 2010;36:699-706.
73. Bea S, Salaverria I, Armengol L, et al. Uniparental disomies, homozygous deletions, amplifications, and target genes in mantle cell lymphoma revealed by integrative high-resolution whole-genome profiling. *Blood*. 2009;113:3059-3069.
74. Perez-Galan P, Roue G, Villamor N, et al. The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood*. 2006;107:257-264.
75. Hartmann EM, Campo E, Wright G, et al. Pathway discovery in mantle cell lymphoma by integrated analysis of high-resolution gene expression and copy number profiling. *Blood*. 2010;116:953-961.
76. Honma K, Tsuzuki S, Nakagawa M, et al. TNFAIP3/A20 functions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 2009;114:2467-2475.
77. White-Gilbertson S, Kurtz DT, Voelkel-Johnson C. The role of protein synthesis in cell cycling and cancer. *Molecular oncology*. 2009;3:402-408.

78. Kaul G, Pattan G, Rafeequi T. Eukaryotic elongation factor-2 (eEF2): its regulation and peptide chain elongation. *Cell biochemistry and function*. 2011;29:227-234.
79. Sivan G, Kedersha N, Elroy-Stein O. Ribosomal slowdown mediates translational arrest during cellular division. *Molecular and cellular biology*. 2007;27:6639-6646.
80. Jorgensen R, Merrill AR, Andersen GR. The life and death of translation elongation factor 2. *Biochemical Society transactions*. 2006;34:1-6.
81. Fitzgerald D, Pastan I. Pseudomonas exotoxin and recombinant immunotoxins derived from it. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1993;685:740-745.
82. Ryazanov AG, Spirin AS. Phosphorylation of elongation factor 2: a key mechanism regulating gene expression in vertebrates. *The New biologist*. 1990;2:843-850.
83. Ryazanov AG, Shestakova EA, Natapov PG. Phosphorylation of elongation factor 2 by EF-2 kinase affects rate of translation. *Nature*. 1988;334:170-173.
84. Browne GJ, Finn SG, Proud CG. Stimulation of the AMP-activated protein kinase leads to activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase and to its phosphorylation at a novel site, serine 398. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279:12220-12231.
85. Cheng EH, Gorelick FS, Czernik AJ, et al. Calmodulin-dependent protein kinases in rat glioblastoma. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 1995;6:615-621.
86. Parmer TG, Ward MD, Yurkow EJ, et al. Activity and regulation by growth factors of calmodulin-dependent protein kinase III (elongation factor 2-kinase) in human breast cancer. *British journal of cancer*. 1999;79:59-64.

87. Tekedereli I, Alpay SN, Tavares CD, et al. Targeted silencing of elongation factor 2 kinase suppresses growth and sensitizes tumors to doxorubicin in an orthotopic model of breast cancer. *PloS one*. 2012;7:e41171.
88. Ashour AA, Abdel-Aziz AA, Mansour AM, et al. Targeting elongation factor-2 kinase (eEF-2K) induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2014;19:241-258.
89. Leprivier G, Remke M, Rotblat B, et al. The eEF2 kinase confers resistance to nutrient deprivation by blocking translation elongation. *Cell*. 2013;153:1064-1079.
90. Nilsson A, Nygard O. Phosphorylation of eukaryotic elongation factor 2 in differentiating and proliferating HL-60 cells. *Biochimica et biophysica acta*. 1995;1268:263-268.
91. Wu H, Yang JM, Jin S, et al. Elongation factor-2 kinase regulates autophagy in human glioblastoma cells. *Cancer research*. 2006;66:3015-3023.
92. Maioli E, Torricelli C, Valacchi G. Rottlerin and cancer: novel evidence and mechanisms. *TheScientificWorldJournal*. 2012;2012:350826.
93. Amin HM, McDonnell TJ, Medeiros LJ, et al. Characterization of 4 mantle cell lymphoma cell lines. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2003;127:424-431.
94. Jeon HJ, Kim CW, Yoshino T, et al. Establishment and characterization of a mantle cell lymphoma cell line. *British journal of haematology*. 1998;102:1323-1326.
95. Bodrug SE, Warner BJ, Bath ML, et al. Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene. *The EMBO journal*. 1994;13:2124-2130.

96. Lovec H, Grzeschiczek A, Kowalski MB, et al. Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. *The EMBO journal*. 1994;13:3487-3495.
97. Pontano LL, Aggarwal P, Barbash O, et al. Genotoxic stress-induced cyclin D1 phosphorylation and proteolysis are required for genomic stability. *Molecular and cellular biology*. 2008;28:7245-7258.
98. Klier M, Anastasov N, Hermann A, et al. Specific lentiviral shRNA-mediated knockdown of cyclin D1 in mantle cell lymphoma has minimal effects on cell survival and reveals a regulatory circuit with cyclin D2. *Leukemia*. 2008;22:2097-2105.
99. Weinstein S, Emmanuel R, Jacobi AM, et al. RNA inhibition highlights cyclin D1 as a potential therapeutic target for mantle cell lymphoma. *PloS one*. 2012;7:e43343.
100. Tiemann K, Alluin JV, Honegger A, et al. Small interfering RNAs targeting cyclin D1 and cyclin D2 enhance the cytotoxicity of chemotherapeutic agents in mantle cell lymphoma cell lines. *Leukemia & lymphoma*. 2011;52:2148-2154.

