T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ATP11C'NİN PRE-B HÜCRELERİNİN IgM^+ B HÜCRELERİNE FARKLILAŞMASI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

SEDA ARAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: DR. ÖĞR. ÜYESİ MEHMET YABAŞ

EDİRNE-2022

SEDA ARAL'ın hazırladığı "**ATP11C'NİN PRE-B HÜCRELERİNİN IgM$^+$ B HÜCRELERİNE FARKLILAŞMASI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad): İmza

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet YABAŞ ……

Üye: Doç. Dr. Jülide TOZKIR ……

Üye: Doç. Dr. Ahmet EKEN ……

Tez Savunma Tarihi: 14/12/2022

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet YABAŞ

Tez Danışmanı ……

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

……

Prof. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

14/12/2022
Seda ARAL

Yüksek Lisans Tezi

ATP11C'nin Pre-B Hücrelerinin IgM^+ B Hücrelerine Farklılaşması Üzerine Etkisinin Araştırılması

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Bağışıklık sistemi, organizmayı çevresindeki enfeksiyon ajanlarına karşı koruyan bir sistemdir. Patojenlere karşı daha spesifik yanıtlar oluşturabilen edinsel immün sistemin B hücreleri, antikor üretebilme potansiyellerinden dolayı oldukça önemlidir. Dolayısıyla, B hücrelerinin gelişimlerinin ve fonksiyonlarının bilinmesi, B hücre kaynaklı hastalıkların nedenlerinin daha iyi anlaşılması ve klinikte uygulanabilecek yeni yöntemlerin geliştirilmesi açısında kritik öneme sahiptir. Ökaryotlarda plazma zarı, çift tabakalı ve asimetrik olarak dağılmış aminofosfolipitlerden oluşmuştur. Plazma zarındaki fosfolipit asimetrisinin oluşumu ve devamının sağlanması hücrelerin canlılığı ve fonksiyonları açısından oldukça önemlidir. P4-tip ATPaz ailesinin üyeleri olan flipazlar, hücre zarının dış kısmından iç kısmına doğru lipit taşıyarak plazma zarı lipit asimetrisinin sağlanmasına katkıda bulunurlar. Yakın zamanda flipazlardan biri olan ATP11C enzimini kodlayan gendeki mutasyonların fare kemik iliğinde B hücrelerinin pro-B hücresinden pre-B hücresine geçişindeki gelişim basamağını etkileyerek B hücrelerinin sayısının azalmasına neden olduğu gösterilmiştir, ancak etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir.

Bu tez çalışmasında, *Atp11c* geni susturulmuş bir pre-B hücre hattı kullanılarak, ATP11C'nin pre-B hücrelerindeki rolü araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar ATP11C-

defektli pre-B hücrelerinin normal hücrelere göre azalmış flipaz aktivitesine sahip olduklarını göstermiştir. Ayrıca, sonuçlar ATP11C'nin pre-B hücrelerinin IL-7'ye bağımlı proliferasyonları üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığını göstermiştir. Fakat sonuçlarımız, IL-7'nin ortamdan uzaklaştırılması sonrasında ATP11C-defektli hücrelerin bir sonraki evre olan IgM^+ olgunlaşmamış B hücrelerine farklılaşamadıklarını göstermiştir. Sonuç olarak, bu tez çalışması ATP11C'nin pre-B hücrelerinin plazma zarındaki en etkin flipaz aktivitesine sahip P4-tip ATPaz'lardan biri olduğunu ilk kez göstermiştir. Ayrıca, ATP11C'nin pre-B hücrelerinin IL-7'ye bağımlı proliferasyonlarını etkilemediğini, fakat olgunlaşmamış B hücrelerine farklılaşmalarını kontrol ettiğini göstermiştir.

Yıl : 2022

Sayfa Sayısı : 61

Anahtar Kelimeler : ATP11C, pre-B hücresi, flipaz, immünoloji

Master Thesis

Investigation of the effect of ATP11C on differentiation of pre-B cells into IgM^+ B cells

Trakya University Institute of Natural and Applied Sciences

Department of Biotechnology and Genetics

ABSTRACT

The immune system protects the organisms against infectious agents found in their environment. B cells of the adaptive immune system are critical by their ability to produce specific antibodies against pathogens. Thus, better understanding the development and function of B cells is important for the development of new therapeutic approaches that can be applied in the clinic. In eukaryotes, the plasma membrane is composed of bilayers and asymmetrically distributed aminophospholipids. The generation and dynamic maintenance of phospholipid asymmetry in the plasma membrane is crucial for the survival and function of cells. The members of the P4-type ATPase, known as flippases, contribute to the generation and maintenance of the plasma membrane lipid asymmetry by transporting lipids from the outer leaflet of the cell membrane to the inner leaflet. Mutations in the gene encoding one of the flippases, ATP11C, have been shown to affect B cell development in the mouse bone marrow at the transition from pro-B to pre-B cell stage, resulting in a decrease in the number of B cells. However, the mechanism underlying the B cell phenotype in ATP11C-deficient mice remains unknown.

In this thesis, the role of ATP11C in pre-B cells was investigated by using a pre-B cell line in which the *Atp11c* gene was silenced. The results showed that ATP11C-deficient pre-B cells had decreased flippase activity compared to control cells.

Moreover, our findings revealed that ATP11C had no effect on IL-7 dependent proliferation of pre-B cells. However, ATP11C-deficient pre-B cells failed to differentiate into IgM^+ immature B cells upon removal of IL-7. In conclusion, this thesis demonstrated for the first time that ATP11C is the most predominant flippase in the plasma membrane of pre-B cells. We also showed that ATP11C does not affect the IL-7-dependent proliferation of pre-B cells, but controls their differentiation into immature B cells.

Year : 2022

Number of Pages : 61

Keywords : ATP11C, pre-B cell, flippase, immunology

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca canı gönülden tüm bilgi ve donanımıyla yolumu aydınlatan, motivasyonu ile eğitim sürecini keyifle öğrenerek dolu dolu tamamlamama yardımcı olan değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Mehmet YABAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez çalışmasında yardımları için Öğr. Gör. Dr. Ayten BOSTANCI'ya da teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca desteklerini hep arkamda hissettiğim yüksek lisans eğitim sürecimde de beni asla yalnız bırakmayan sevgili aileme teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (TÜBAP) tarafından desteklenen 2019/280 numaralı proje kapsamında Trakya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik bölümünde gerçekleştirilmiştir. Araştırmada kullanılan hücrelerin analizleri Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan flow sitometri cihazı kullanılarak yapılmıştır.

İÇİNDEKİLER

ÖZET iv

ABSTRACT vi

TEŞEKKÜR viii

İÇİNDEKİLER ix

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xi

ÇİZELGELER DİZİNİ xiii

ŞEKİLLER DİZİNİ xiv

BÖLÜM 1 1

GİRİŞ VE AMAÇ 1

BÖLÜM 2 4

GENEL BİLGİLER 4

2.1 İmmün Sistem 4

2.2 Edinsel İmmün Sistemin Elemanları 5

2.2.1 B Hücre Gelişimi 7

2.2.2 IL-7R ve Pre-BCR Sinyal Yolaklarının Erken B Hücre Gelişimindeki Önemi 11

2.3 Hücre Zarı 14

2.3.1 Yapısı 14

2.3.2 Hücre Zarı Lipit Asimetrisi 15

BÖLÜM 3 18

MATERYAL VE METOT 18
3.1 Materyal 18
3.1.1 Hücre Hatları 18
3.1.2 Kullanılan Sarf Malzemeler Ve Cihazlar 19
3.2 Metot 21
3.2.1 WK3 Hücrelerinin Kültürü 21
3.2.2 Flipaz Aktivitesinin Testi 21
3.2.3 CFSE İşaretlemesi İle Proliferasyon Testi 22
3.2.4 Pre-B Hücrelerinin $Ig\kappa^{+}Igm^{+}$ Olgunlaşmamış B Hücrelerine Farklılaşmanın Test Edilmesi 23
3.2.5 İstatistiksel Analiz 24
BÖLÜM 4 25
BULGULAR 25
4.1 ATP11C Eksikliği Pre-B Hücrelerinde Defektli Flipaz Aktivitesine Neden Olur 25
4.2 ATP11C Kaybı Pre-B Hücrelerinin IL-7'ye Bağımlı Proliferasyonlarını Etkilemez 33
4.3 ATP11C Eksikliği WK3 Pre-B Hücrelerinin $Ig\kappa^{+}IgM^{+}$ Olgunlaşmamış B Hücrelerine Farklılaşmalarını Etkiler 30
BÖLÜM 5 32
TARTIŞMA 32
KAYNAKLAR 38
ÖZGEÇMİŞ 46

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATP : Adenozin Trifosfat

APC : Antijen Sunan Hücreler (Antigen Presenting Cells)

BCR : B Hücre Reseptörü (B Cell Receptor)

BSA : Bovine Serum Albumin

^{o}C : Santigrat Derece

Ca^{+2} : Kalsiyum

$CaCl_2$: Kalsiyum Klorür

CD : Yüzey Farklılaşma Antijenleri (Cluster of Differentiation)

COOH : Karboksilik Asit

DMSO : Dimetil Sülfoksit

DNA : Deoksiribonükleik Asit

ER : Endoplazmik Retikulum

Fab : Antijen Bağlayan Bölge

FBS : Fetal Bovine Serum

Fc : Kristalize Olabilen Bölge

Ig : İmmunoglobülin

IL-7 : İnterlökin-7

IL-7R : İnterlökin-7 Reseptörü

$MgCl_2$: Magnezyum Klorür

MHC : Doku Uygunluk Kompleksi (Major Histocompatibility Complex)

mM : Mili molar

mRNA : Mesajcı Ribonükleik Asit

μM : Mikro molar

NDB-PS : 1-palmitoyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) amino]hexanoyl}-sn-glycero-3-phosphoserine

NH_2 : Amino Grubu

PBS : Phosphate Buffered Saline

PC : Fosfatidilkolin

PE : Fosfatidiletanolamin

PS : Fosfatidilserin

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RAG : Rekombinasyon Aktive Edici Gen

RNA : Ribonükleik Asit

SM : Sfingomyelin

TCR : T Hücre Reseptörü (T Cell Receptor)

TÜTAGEM : Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Farklı B hücre ağır zincirleri 10

Çizelge 3.1. Kullanılan malzemeler 19

Çizelge 3.2. Kullanılan cihazlar 20

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Bir IgG1 antikorunun moleküler yapısı. 6

Şekil 2.2. İmmün sistem hücreleri. 9

Şekil 2.3. B hücre gelişim basamakları. 9

Şekil 2.4. Erken B hücre gelişiminde IL-7R ve pre-BCR sinyal yolakları..... 12

Şekil 2.5. Pre-BCR sinyal yolağının erken B hücre gelişimindeki rolü. 14

Şekil 2.6. Hücre zarında fosfolipit taşınması. 16

Şekil 4.1. Flipaz aktivitesinin testi için uygulanan kapılama stratejisi..... 27

Şekil 4.2. ATP11C-defektli pre-B hücreler azalmış flipaz aktivitesine sahiptir..... 27

Şekil 4.3. Proliferasyon ve farklılaşma deneylerinin analizi için kapılama strateji. 29

Şekil 4.4. WK3 pre-B hücrelerinde ATP11C eksikliği hücrelerin IL-7'ye bağlı proliferasyonlarını etkilemez..... 30

Şekil 4.5. ATP11C-defektli WK3 pre-B hücreleri IL-7'sız bırakıldıklarında $Ig\kappa^{+}IgM^{+}$ olgunlaşmamış B hücrelerine farklılaşmada başarısız olurlar..... 31

BÖLÜM 1

GİRİŞ VE AMAÇ

İmmün sistem, organizmayı çevresinde sürekli maruz kaldığı enfeksiyon ajanlarına karşı koruyan ve çeşitli hücre, doku ve organlardan oluşmuş bir sistemin bütünüdür. Doğal (innate) ve edinsel (adaptif, kazanılmış) olarak bilinen iki alt koldan oluşmaktadır. Doğal bağışıklık, doğuştan gelen bir sistem olup vücudun ilk savunma hattı olarak bilinir ve davetsiz misafirlere karşı anında koruma sağlar. Edinsel immünite ise daha karmaşık bir sistem olup patojenlere karşı spesifik bir cevap oluşturabilen B ve T hücrelerinden oluşmaktadır. B hücrelerinin yüzeylerinde B hücre reseptörleri (B cell receptor, BCR), T hücrelerinin yüzeylerinde ise T hücre reseptörleri (T cell receptor, TCR) adı verilen ve antijen tanımayı sağlayan yapılar vardır. Her bir lenfosit yüzeyinde yalnızca spesifik bir antijen tanıyabilecek reseptör taşımaktadır. Mükemmel derecede özgüllük gösteren reseptörlerin patojenlerle etkileşimleri sonrasında ilgili lenfositler aktive olur. Fonksiyonel B lenfositler antikor üreterek yanıt oluştururken, fonksiyonel T hücreleri CD4 yardımcı T (T helper) hücre ve CD8 sitotoksik T (T cytotoxic) hücre alt gruplarına dönüşerek görev yaparlar. Yardımcı T lenfositleri bağışıklık sisteminin tepkisini düzenleyen sitokinler salgılayarak diğer immün sistem hücrelerinin görevlerini yapmalarına yardımcı olurken, sitotoksik T hücreleri virüs ile enfekte olmuş hücreleri ve tümör hücrelerini öldürebilme potansiyellerine sahiptir (Janeway, 1999).

B hücreleri, antikor üretme potansiyeli ile bağışıklık sistemi için oldukça önemli bir hücre grubudur. Dolayısıyla B hücre gelişimlerinin ve fonksiyonlarının moleküler

seviyede daha iyi bilinmesi, B hücre aracılı hastalıkların mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına ve klinikte uygulanabilecek yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkıda bulunacaktır. B hücreleri, memelilerde kemik iliğindeki kök hücrelerden köken alır ve yine kemik iliğinde ve daha sonra sekonder lenfoid organlarda çeşitli gelişim basamaklarını tamamlayarak olgunlaşır. Bu gelişim basamakları çeşitli sinyal yolakları, büyüme faktörleri ve transkripsiyon faktörleri gibi farklı mekanizmalar ile kontrol edilmektedir (Herzog vd., 2009).

Hücre zarı, hücrenin iç ortamını dış çevreden ayıran bir yapıdır. Ökaryotlarda hücre zarı çift tabakalı lipitlerden oluşmuştur ve bu lipitler gelişigüzel değil asimetrik olarak dağılım göstermektedir (Ikeda vd., 2006). Diğer bütün hücreler gibi bağışıklık sistemi hücrelerinin plazma zarları da asimetrik olarak dağılım gösteren çift katmanlı lipit moleküllerinden oluşmuştur. Aminofosfolipitler hücre zarındaki lipitlerin büyük bir kısmını oluşturmaktadırlar. Hücre zarı çift tabakalı olacak şekilde fosfatidilserin (PS), fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilkolin (PC) ve sfingomyelinden (SM) meydana gelir (Leventis & Grinstein, 2010). PS ve PE çoğunlukla hücre zarının iç kısmında bulunurken PC, SM ve glikosfingolipitler plazma zarının dış kısmında bulunur (Bretscher, 1972; Gordesky & Marinetti, 1973; Verkleij vd., 1973). Hücre zarı lipit asimetrisi, hücrelerin iç dengesini koruyarak varlığını sürdürebilmesi ve görevlerini yapabilmeleri için oldukça önemlidir. Hücre zarı lipit asimetrisinin oluşturulması ve bu dinamik yapının korunmasında flipazlar, flopazlar ve skramblazlar olarak isimlendirilen üç grup enzim rol oynamaktadır (Pomorski & Menon, 2016). Flipaz ve flopazlar ATP'ye bağımlı olarak tek yönlü fosfolipit taşıması yaparken (flipazlar dıştan içe, flopazlar içten dışa), skramblazlar Ca^{+2}'ye bağımlı olarak çift yönlü taşıma yapar (Daleke, 2003; Graham, 2004).

Hücre zarının dış kısmından iç kısmına fosfolipit taşıyan flipazlar P4-tip ATPaz ailesine aittir. İnsanlarda 14 farelerde ise 15 üyesi olan P4-tip ATPazların biyolojik sistemlerdeki görevleri çok fazla bilinmemektedir (Lopez vd., 2013). Flipazların immün sistem için önemleri, 2011 yılında ATP11C-defektli fareler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda ortaya konmuş ve bağışıklık sistemi elemanlarından biri olan B hücreleri üzerine etkisi bulunmuştur (Siggs vd., 2011; Yabas vd., 2011). P4-tip ATPaz ailesinin üyelerinden biri olan ATP11C enzimini kodlayan gendeki nokta mutasyonlarının farelerde B hücre yetmezliğine neden olduğu gösterilmiştir (Siggs vd., 2011; Yabas vd.,

2011). Yapılan çalışmalar mutant fare kemik iliğindeki B hücre gelişiminin pro-B evresinden pre-B evresine geçişinde gelişimsel blok olduğu ve bunun sonucunda ise mutasyonlu farelerde B hücre sayısında önemli derecede azalma olduğu raporlanmıştır (Siggs vd., 2011; Yabas vd., 2011). Dahası, ATP11C-defektli hücrelerin hücre zarının dış kısmından iç kısmına doğru daha az PS ve PE transferi yapabildiği raporlanmış (Yabas vd., 2011; Yabas vd., 2014; Yabas vd., 2016) ve mutasyonun farelerde anemiye neden olduğu gösterilmiştir (Yabas vd., 2014). Fakat mutant farelerde pre-B hücreleri gelişmediğinden, ATP11C'nin pre-B hücreleri üzerine olan etkileri tam olarak bilinmemektedir.

Bu tez çalışmasında, ATP11C-defektli bir pre-B hücre hattı kullanılarak ATP11C'nin pre-B hücrelerinin flipaz aktivitesi, IL-7'ye bağımlı proliferasyonları ve bir sonraki evre olan IgM^+ olgunlaşmamış (immature) B hücrelerine farklılaşmaları üzerine olan etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. İmmün Sistem

İmmün sistem, canlı organizmada enfeksiyona sebep olabilecek yabancı ajanları veya tümör hücresi gibi organizma için zararlı olabilecek oluşumları tarar ve kendi içerisinde sistematik bir ağ ile yok ederek organizmanın savunmasını sağlar. Organizmanın savunma mekanizması, yabancı maddelerle karşılaşması sırasında öncelikle ilk koruyucu basamağı oluşturan doğal (innate) bağışıklık ile karşı koyarken sonrasında gerektiğinde işleme katılacak daha özgül ve etkin bir savunma mekanizması olan edinsel (adaptif, kazanılmış) bağışıklık sistemi elemanları ile yanıt vermektedir (Janeway, 1999)

Doğal immünite organizmada doğuştan var olan savunma mekanizmasıdır ve epitel doku, makrofajlar, nötrofiller, dendritik hücreler, bazofiller, eozinofiller, mast hücreleri, doğal öldürücü (Natural Killer, NK) hücreler, gama-delta T hücreleri ve plazma proteinlerinden oluşmaktadır. Doğal bağışıklık sistem hücreleri mikroorganizmalar üzerinde bulunan ortak yapıları tanıyarak hızlı ve özel olmayan bir yanıt oluşturur (Janeway, 1999). Bu sistem patojenle her karşılaşmasında aynı immün yanıtı oluşturmaktadır. Doğal immün sistemin başka bir görevi de edinsel immünitenin aktivasyonunu sağlamaktır ve bunun için iki ayrı uyarı mekanizması kullanır (Janeway, 1999). Birinci uyarı doğal bağışıklık sisteminin mikroorganizmayla etkileşimi sırasında

ortaya çıkan maddeler ile sağlanırken, ikinci uyarı sistemi ise mikroorganizmanın yabancılığını tanıtan moleküllerin (antijen) edinsel sistemin T hücrelerine sunulmasıyla edinsel bağışıklığın uyarılmasıdır (Janeway, 1999).

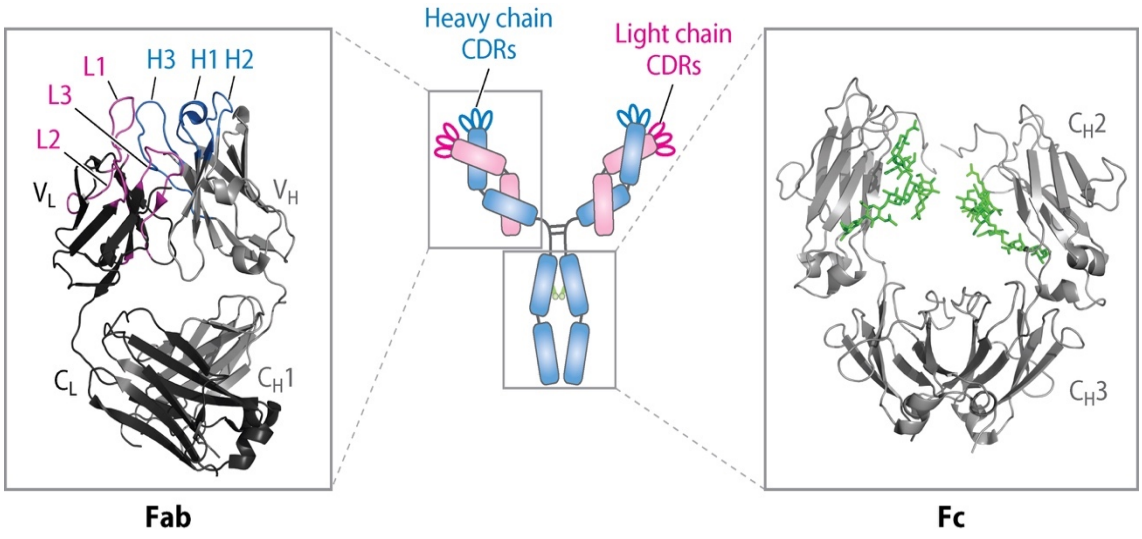
Edinsel bağışıklık ise doğal bağışıklık sistemine karşı direnç gösteren mikroorganizmalara karşı sonradan gelişen bir sistemdir. Edinsel bağışıklık elemanları lenfositler ve onların ürünleridir. Daha özel ancak zaman gerektiren edinsel bağışıklık, hümoral ve hücresel olmak üzere iki tip yanıtla organizmayı enfeksiyon ajanlarına karşı savunur. Hümoral immünite, B lenfositler tarafından salgılanan antikorlar aracılığıyla hücre dışındaki mikroorganizmaların ve artıklarının yok edilmesini sağlar. Fakat antikorlar enfekte hücrelerin içerisine ulaşamazlar, bu aşamada hücresel immünite görev alır ve T hücreleri vasıtasıyla hücre içi patojenlere karşı korunma sağlanmış olur. Edinsel bağışıklık antijenle karşılaşma sonrasında özel bir yanıt oluştururken bu karşılaşmayı hafızasına kaydetmektedir. Bu sayede aynı antijenle daha sonra karşılaşıldığında bellek (memory) hücreleri daha hızlı ve daha etkili bir bağışıklık cevabı oluşturabilecektir (Janeway, 1999).

2.2. Edinsel İmmün Sistemin Elemanları

Edinsel immün sistemin hücresel elemanları B ve T lenfositleri olmak üzere iki tiptir. Bütün lenfositler kemik iliğindeki kök hücrelerden köken alırlar, fakat daha sonra farklı gelişim basamaklarından geçmelerinden dolayı fenotipleri birbirinden farklılık göstermektedir. Bu hücreler taşıdıkları reseptörler, yüzey proteinleri ve gerekli olan transkripsiyon faktörleri ile birbirlerinden ayrıştırılabilmektedir. T hücre öncülleri, kemik iliğinden timüse göç ederek gelişimlerini timüste tamamlarlar. Temel olarak iki tip T hücre alt tipi bulunmaktadır. $CD4^+$ yardımcı T lenfositler çeşitli sitokinler salgılayarak B hücrelerinin fonksiyonel olarak antikor üretmelerine yardımcı olurlar ve makrofaj gibi diğer lökositlerin görevlerini yapmalarını desteklerler. $CD8^+$ sitotoksik T lenfositler ise hem virüsle enfekte olmuş hücreleri hem de tümör hücrelerini öldürebilme yeteneğine sahiptirler. T lenfositler patojen üzerinde bulunan sadece protein yapılı parçacıkları (peptid) tanıma özelliği vardır. Bu peptidler antijen sunan hücreler olarak isimlendirilen özelleşmiş hücrelerde bulunan doku uyumluluk kompleksi (MHC) adı verilen moleküllere bağlı durumdadır. MHC molekülleri

tarafından sunulan antijenler T hücre reseptörleri tarafından tanınır ve T hücresi aktive olarak görevini yerine getirir (Chinen & Shearer, 2003).

B hücreleri ise yapılan birçok çalışmayla tanımlanmış ve tanımlanmaya devam eden farklı yüzey molekülleri ifade etmektedirler (Hardy & Hayakawa, 2001). B hücrelerinin yüzeylerinde bulunan ve antijen tanımayı sağlayan yapılar B hücre reseptörleridir. Bu yapılar immünoglobulinler (Ig) olarak da adlandırılmaktadır. Ig'ler iki özdeş ağır (heavy) ve iki özdeş hafif (light) zincirin birleşiminden oluşmuştur ve görüntüsü ile bir "Y" harfine benzemektedir (Şekil 2.1). Değişken bölgelerin antijene özgü bağlanan uç kısımları fragment of antigen binding (Fab) olarak adlandırılır ve $-NH_2$ grupları içerir. Sabit kısmı fragment of crystallizable region (Fc) olarak adlandırılır ve antikor gruplarının belirlenmesini sağlayıp –COOH gruplarını içermektedir (Şekil 2.1) (Hoffman vd., 2016). Ig molekülleri hem B hücrelerinin yüzeylerinde bulunarak antijen tanınmasını sağlar hem de aktive olmuş bir B hücresi tarafından salgılanarak effektör mekanizmalara katılırlar.



Şekil 2.1. Bir IgG1 antikorunun moleküler yapısı. Bir antikor iki ağır zincir (mavi) ve iki hafif zincirden (pembe) oluşur. (Soldaki şekil) Bir antijen bağlama parçasının kristal yapısı (Fab). (Sağdaki şekil) Kristalize edilebilir parça (Fc) yapısı (Tiller & Tessier, 2015)'den alınmıştır.

2.2.1. B Hücre Gelişimi

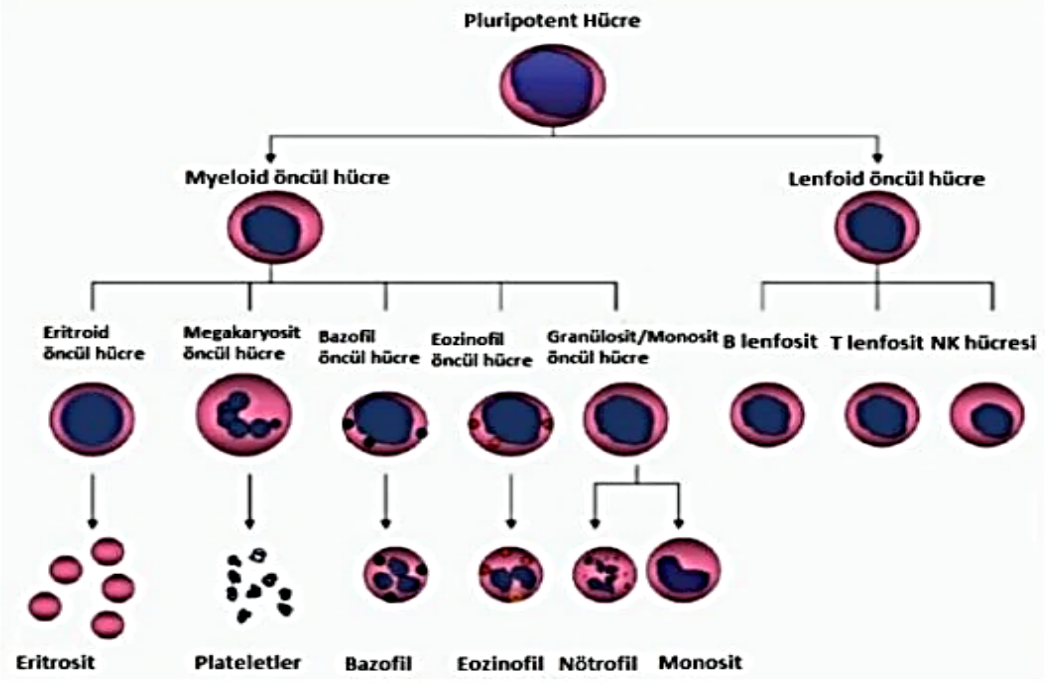
B hücre gelişimi, kemik iliğindeki hematopoietik öncül hücrelerin farklılaşmasıyla oluşmaktadır. Hematopoietik hücreler lenfoid ve myeloid olmak üzere iki ana soya ayrılır. Myeloid soya doğru yönelen hücreler doğal immünitede görev alan hücrelere farklılaşmaktadırlar (Şekil 2.2). Lenfoid soya yönelen hücreler ise çeşitli gelişimsel aşamalardan geçerek edinsel immünitede görev alan B ve T hücrelerine farklılaşırlar (Şekil 2.2).

B hücre gelişimi yaşam boyunca sürmektedir ve kemik iliğinde üretilen lenfositlerin yaklaşık %20'sinin B lenfositler olduğu tahmin edilmektedir (Zehentmeier & Pereira, 2019). B hücrelerinin gelişimi, memelilerde kemik iliğindeki hematopoietik öncül hücrelerin B hücre soyuna farklılaşması, çoğalması ve antijen reseptör genlerinin sentezlenerek yeniden düzenlendiği olayların tamamını kapsar. Tüm basamaklar çeşitli sinyal yolakları, transkripsiyon faktörleri ve kemik iliğindeki mikroçevrede (niche) bulunan çevresel faktörler gibi birçok hücre içi ve hücre dışı faktörler tarafından kontrol edilir (Nutt & Kee, 2007).

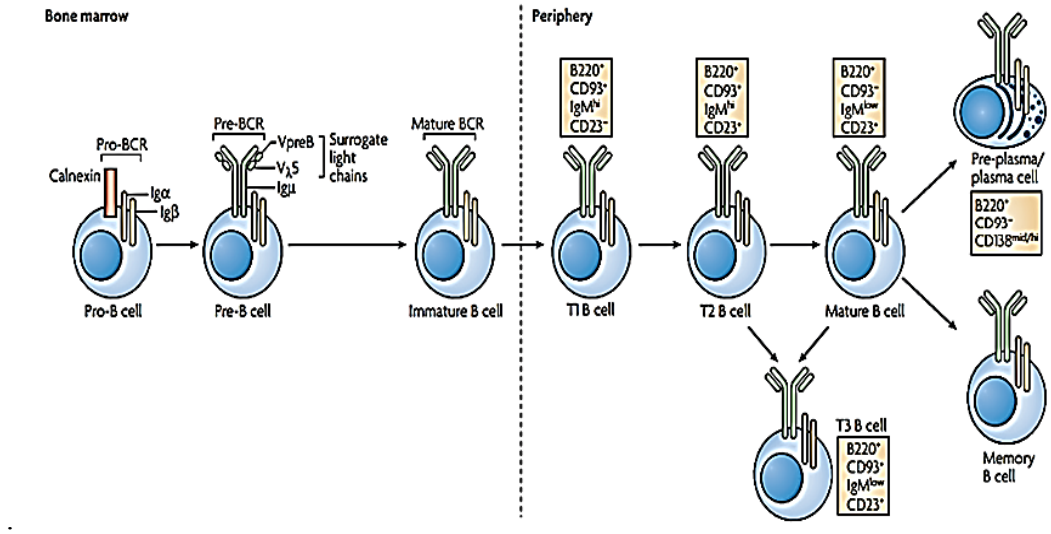
Hematopoietik kök hücrelerden B hücre gelişimi pre/pro-B, pro-B, pre-B (large ve small), olgunlaşmamış (immature) B ve olgun (mature) B hücreleri gibi farklı gelişim basamakları ile karakterize edilirler (Şekil 2.3) (Hardy & Hayakawa, 2001). Farklı B hücre alt gruplarının karakterizasyonları; hücrelerin ifade ettiği yüzey molekülleri, Ig gen düzenlemeleri, ihtiyaç duydukları büyüme faktörleri ve transkripsiyon faktörlerine bağlı olarak yapılmaktadır (Hardy & Hayakawa, 2001). En erken B hücre öncülleri pre/pro-B hücreleri olarak bilinir ve $Ly6D^+$ ortak lenfoid öncüllerinden (common lymphoid progenitors, CLP) gelişir (Inlay vd., 2009). Bu hücreler, B hücre markırı olan B220 ifade ederler ve B220'ye ilave olarak CD19'un da ifade edilmesi sonrasında bir sonraki evre olan pro-B hücrelerine farklılaşırlar (Şekil 2.3). Pro-B evresinde hücreler ağır zincir D-J ve sonrasında da V-DJ rekombinasyonuna uğrarlar. Oluşan bu gen birinci transkripte çevrilerek VDJ parçası kıvrılma gösterir ve μ zincirinin 5' C kısmına eklenerek mRNA oluşturulur. Böylece sitoplazmada fonksiyonel bir Igμ ağır zincir üretilmiş olur. Fare pro-B hücreleri yaşamları ve proliferasyonları için İnterlökin (IL)-7 adı verilen bir sitokine bağımlıdırlar (Corfe & Paige, 2012). Yapılan çalışmalar IL-7 veya IL-7R sinyal yolakları eksik olan farelerin B

hücre gelişimlerinin pre/pro-B hücre evresinden itibaren defektli olduğunu göstermiştir (Peschon vd., 1994; von Freeden-Jeffry vd., 1995). Daha sonra üretilen Igμ, vekil hafif zincir (surrogate light chain) proteinleri olan VpreB ve λ5 ile bir araya gelir ve hücre yüzeyinde pre-BCR oluşturulur (Şekil 2.3). Pre-BCR oluşumunda Igμ, VpreB ve λ5'e ilave olarak Igα ve Igβ adı verilen alt birimler de bulunur. Fonksiyonel bir pre-BCR oluşumu hücrelerin pro-B hücre evresinden pre-B hücre evresine geçişi için gereklidir. Ayrıca pre-BCR oluşumu, pre-B hücrelerinin yaşamı, proliferasyonları ve farklılaşmaları için de oldukça önemlidir (Clark vd., 2014; Hendriks & Middendorp, 2004; Herzog vd., 2009). Yapılan çalışmalar fonksiyonel olmayan bir pre-BCR yolağının hem farelerde hem de insanlarda B hücre yetmezliğine neden olduğunu ve B hücrelerin kemik iliğindeki pro-B hücre evresinde kalıp daha sonraki hücre grubuna (pre-B hücrelerine) farklılaşamadıklarını göstermiştir (Gong & Nussenzweig, 1996; Kitamura vd., 1992; Kitamura vd., 1991; Mundt vd., 2001; Pelanda vd., 2002; Torres vd.,1996). Dolayısıyla pre-BCR ifadesi ve sinyalizasyonu kemik iliğindeki erken B hücre gelişiminde önemli bir kontrol noktasıdır (Clark vd., 2014; Herzog vd., 2009).

Fonksiyonel pre-BCR oluşturabilen hücreler IL-7'ye bağımlı olarak hücre bölünmesine uğrarlar (large pre-B hücreleri) ve bu sayede fonksiyonel pre-BCR taşıyan hücre sayısını arttırırlar (Rolink vd., 2000). IL-7'ye bağımlı proliferasyon sonucu yeterli hücre sayısına erişildiğinde pre-B hücreleri hücre döngüsünden çıkarak dinlenme evresine geçer (small pre-B hücreler). Bu hücreler daha sonra hafif zincir V-J rekombinasyonuna uğrayarak fonksiyonel bir κ veya λ hafif zincir sentezler ve sonuçta pre-B hücreleri yüzeylerinde IgM'yi ifade ederek olgunlaşmamış (immature) B hücrelerini oluştururlar (Şekil 2.3). Olgunlaşmamış B hücreleri kemik iliğinden çıkıp dalak gibi periferik lenfoid organlara göç eder ve olgunlaşma basamağını orada tamamlar. Olgunlaşmanın son basamağı olan IgD sentezlenmesi ve IgM ile birlikte ko-ekspresyonudur. Yüzeyinde hem IgM hem de IgD ifade eden hücreler antijene karşı yanıt oluşturabilen olgun B hücreleri olarak dolaşıma katılır (Şekil 2.3).



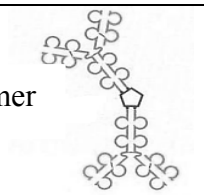
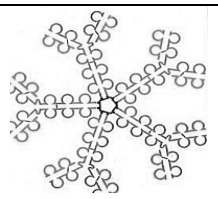
Şekil 2.2. İmmün sistem hücrelerinin gelişimleri. Bütün immün sistem hücreleri kemik iliğindeki hematopoietik kök hücrelerden köken alıp myeloid ve lenfoid olmak üzere iki ana soya ayrılır (Özdemirli, 2010)'dan alınmıştır.



Şekil 2.3. B hücre gelişim basamakları. Kemik iliği ve dalak gibi sekonder lenfoid organlardaki B hücre gelişiminin basamakları ve farklı hücre gruplarını tanımlamak için kullanılan bazı yüzey reseptörler verilmiştir (Cambier vd., 2007)'den alınmıştır.

Olgun Ig'lerin yapısında bulunan hafif zincirler κ ve λ olmak üzere iki çeşittir, fakat her bir B hücresi hafif zincirlerden sadece bir tanesini taşımaktadır. Buna rağmen B hücreleri farklı ağır zincir bulundurabilirler ve taşıdıkları ağır zincir tipine göre isimlendirilir (Çizelge 2.1). Farklı Ig'ler bağışıklık sisteminde farklı rollere sahiptir.

Çizelge 2.1. Farklı B hücre ağır zincirleri
(Abbas vd., 2015'den modifiye edilmiştir).

Antikor İzotip	**Ağır Zincir**	**Sentezlenen Şekli**	**İşlevi**
IgA	α	Monomer, dimer 	Mukozal bağışıklık
IgD	δ	YOK	Naif B hücre antijen reseptörü
IgE	ε	Monomer 	Mast hücre aktivasyonu
IgG	γ	Monomer 	Yeni doğan immünitesi, B hücrelerinin geri dönüşümlü baskılanması
IgM	μ	Pentamer 	Naif B hücre antijen reseptörü, kompleman aktifliği

2.2.2. IL-7R ve Pre-BCR Sinyal Yolaklarının Erken B Hücre Gelişimindeki Önemi

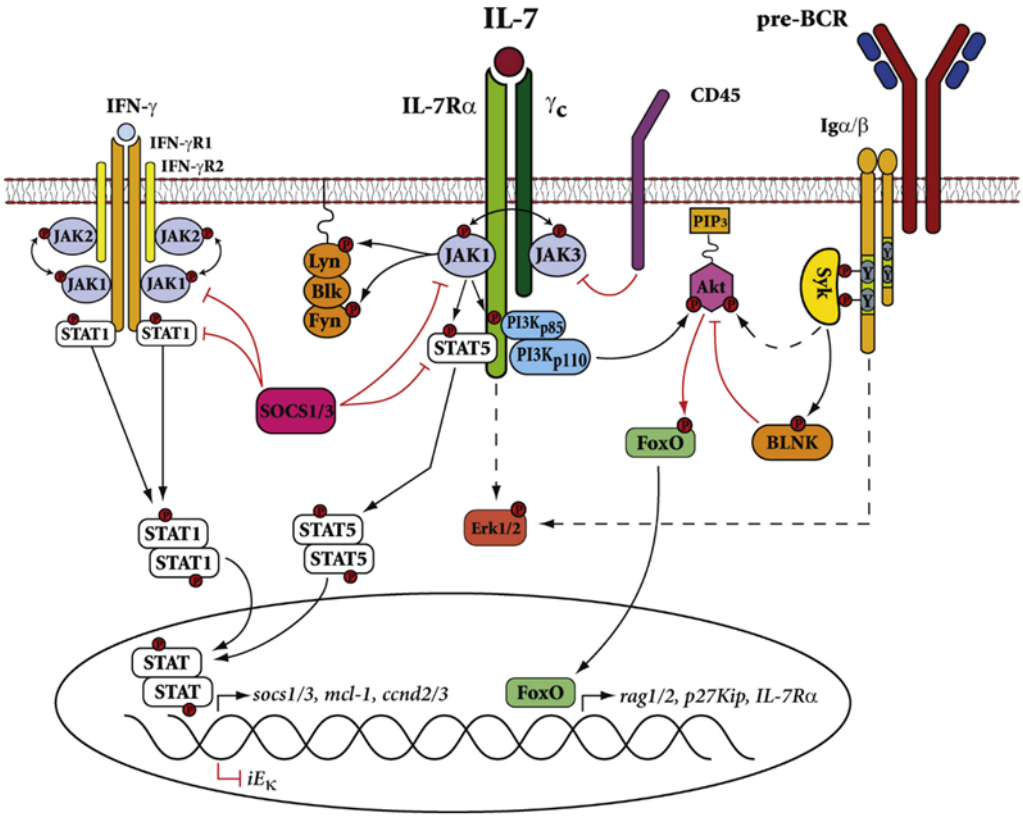
Önceki bölümde bahsedildiği gibi, memeli kemik iliğindeki B hücre gelişiminde IL-7R ve pre-BCR sinyal yolakları belirli işlevlerin ve sinyalizasyonun başlatılmasında önem taşır. Bu kısımda bu sinyal yolaklarına kısaca değinilecektir.

IL-7R'ün B hücreler için önemi, IL-7 veya IL-7R sinyal yolakları eksik olan farelerde B hücre gelişimlerinin pre/pro-B hücre evresinden itibaren defektli olduğunun bulunmasıyla ortaya konmuştur (Peschon vd., 1994; von Freeden-Jeffry vd., 1995). Daha sonra yapılan çalışmalar, IL-7R sinyal yolağının B hücrelerinin yaşamı, proliferasyonu ve farklılaşması gibi farklı biyolojik süreçleri etkilediği gösterilmiştir (Corfe & Paige, 2012). Buna karşın, IL-7 fetal karaciğerdeki B hücre gelişimi için gerekli değildir (Corfe & Paige, 2012). Benzer şekilde, insanlarda IL-7Rα'yı kodlayan gendeki mutasyonların herhangi bir B hücre fenotipine neden olmadığı raporlanmış, dolayısıyla IL-7'nin insanlardaki B hücre gelişimi için gerekli olmadığı ortaya konmuştur (Puel vd., 1998). IL-7, B hücrelerinin yaşamı, proliferasyonu ve gelişimini 3 temel sinyal yolağını aktive ederek yapar. Bunlar; JAK-STAT yolağı, PI3K-AKT yolağı ve MAPK-ERK yolağıdır (Şekil 2.4) (Corfe & Paige, 2012).

IL-7R aracılığı ile STAT5 aktivasyonu özellikle B hücrelerin proliferasyonu ve yaşamı için oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalar JAK3 ve STAT5a/b defektli farelerde B hücre gelişiminin pre/pro-B hücre aşamasında durduğu ve bu farelerde B hücre yetmezliği ortaya çıktığı raporlanmıştır (Nosaka vd., 1995; Thomis vd., 1995; Yao vd., 2006). Aktif STAT5, pro-B ve pre-B hücrelerinin proliferasyonları için gerekli olan Cyclin D3 gibi hedef proteinlerin uyarımını sağlamaktadır (Şekil 2.4) (Mandal vd., 2009). Ayrıca, STAT5 anti-apoptotik bir protein olan MCL-1'i aktive eder (Şekil 2.4) (Malin vd., 2010). MCL-1'e ilave olarak, IL-7'nin anti-apoptotik proteinler BCL-2 ve BCL_{XL} ve pro-apoptotik proteinler BAX, BAD ve BIM ekspresyonlarını regüle ederek B hücrelerinin yaşamını desteklediği gösterilmiştir (Corfe & Paige, 2012).

IL-7 aracılı PI3K-AKT yolağı da erken B hücrelerinin gelişimi için oldukça önemlidir (Şekil 2.4). Zira PI3K defektli farelerde veya PI3K inhibitörlerinin kullanıldığı durumlarda pro-B hücrelerinin IL-7'ye bağımlı proliferasyonlarının azaldığı ve B hücre gelişiminin pro-B hücre safhasında durduğu gözlenmiştir (Corcoran vd.,

1996; Fleming & Paige, 2001). Yine, IL-7R aracılı PI3K-AKT yolağı erken B hücrelerinin yaşamı ve PI3K-AKT üzerinden RAG proteinlerinin regülasyonu için de önemlidir (Şekil 2.4). JAK-STAT ve PI3K-AKT yolaklarına ilave olarak, IL-7'nin reseptörüne bağlanması MAPK-ERK yolağını da aktive etmektedir (Şekil 2.4), fakat bu yolağın B hücre gelişimindeki önemi diğer iki yolağa göre daha az bilinmektedir.



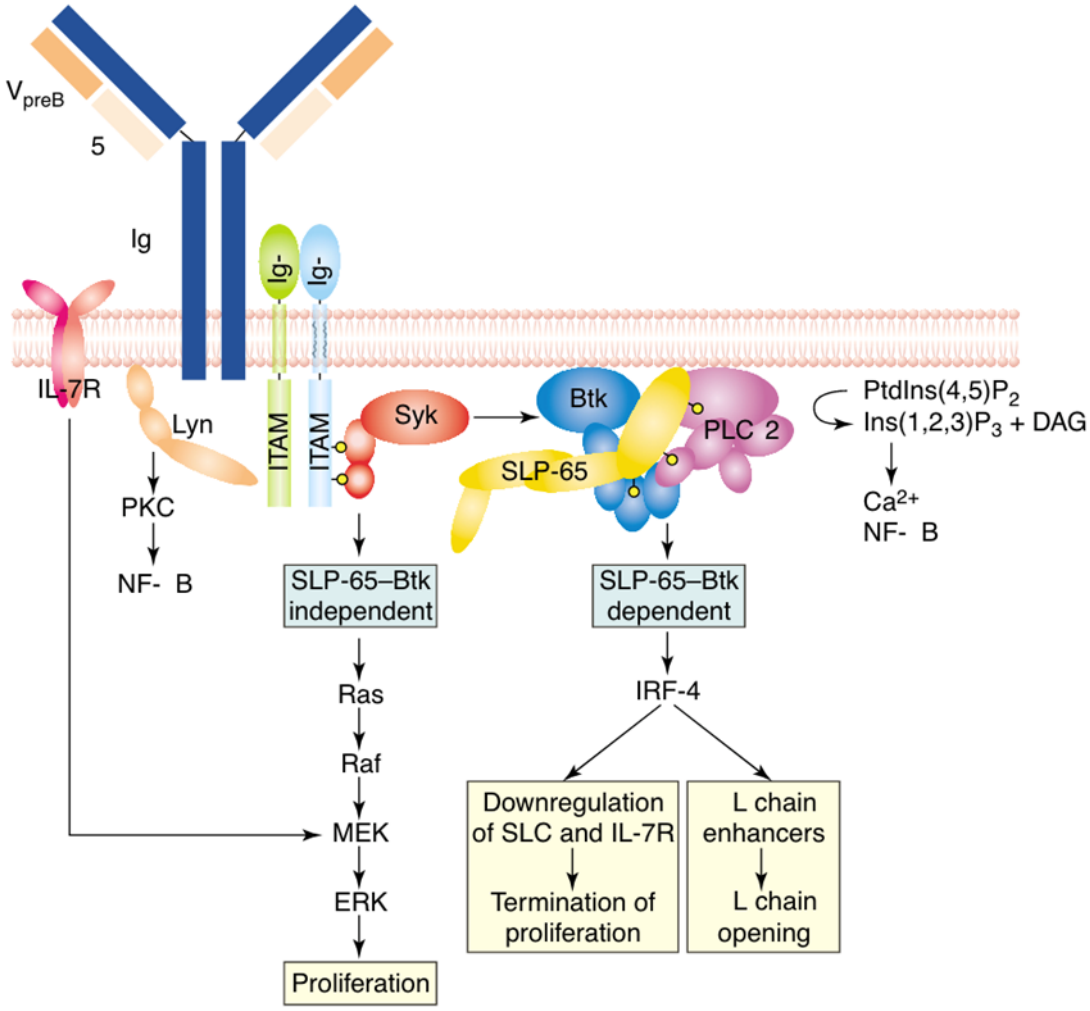
Şekil 2.4. Erken B hücre gelişiminde IL-7R ve pre-BCR sinyal yolakları. IL-7R ve pre-BCR sinyal yolakları kemik iliğindeki erken B hücre gelişimlerini farklı sinyal yolaklarını aktive ederek kontrol ederler (Corfe & Paige, 2012)'den alınmıştır.

IL-7R sinyaline ek olarak pre-BCR sinyal yolağı da erken B hücre gelişiminde önemli bir kontrol noktasıdır (Şekil 2.5). Pre-BCR'nin hücre yüzeyindeki ekspresyonundaki veya sinyal yolağındaki herhangi bir problem B hücre gelişiminin pro-B hücre evresinde durmasına neden olmaktadır (Gong & Nussenzweig, 1996; Kitamura vd., 1992; Kitamura vd., 1991; Mundt vd., 2001; Pelanda vd., 2002; Torres vd., 1996).

IL-7'den faklı olarak pre-BCR sinyal yolağı insanlardaki B hücre gelişimi için de oldukça önemlidir, zira insanlarda λ5 proteinini kodlayan gendeki mutasyonlar B hücre gelişiminin durmasına neden olmuştur (Minegishi vd., 1998). Pre-BCR sinyal yolağında Syk, Btk, SLP-65, PLC-2 gibi birçok protein rol oynamaktadır (Şekil 2.5). Pre-BCR aktivasyonu SLP-65-Btk bağımlı ve SLP-65-Btk bağımsız olarak aktive olur ve farklı yolaklar üzerinden erken B hücre gelişimini kontrol ederler (Şekil 2.5).

B hücre gelişimindeki pre-B hücreleri iki farklı safhada incelenebilmektedir (large pre-B hücreleri ve small pre-B hücreleri). İlk olarak yüzeyinde fonksiyonel bir pre-BCR taşıyan hücreler IL-7'ye bağımlı olarak çoğalır ve bu sayede fonksiyonel pre-BCR taşıyan hücrelerin sayısı artırılmış olur (Ras-ERK aktivasyonu vasıtasıyla proliferasyon safhası, large pre-B hücreleri) (Şekil 2.5). İkinci safha ise matürasyon safhası olarak adlandırılır ve hücreler proliferasyonlarını durdurarak Ig hafif zincir rekombinasyonuna uğrar ve ağır zincir ile eşleşebilecek fonksiyonel bir hafif zincir üretilir (IRF4 aktivasyonu vasıtasıyla hafif zincir rekombinasyonu safhası, small pre-B hücreleri) (Şekil 2.5). Başarılı hafif zincir sentezi sonrasında IgM hücre yüzeyinde eksprese edilir ve bu hücreler olgunlaşmamış B hücreleri olarak adlandırılır. Bu hücreler daha sonra kemik iliğini terk ederek dalak gibi sekonder organlara göç ederler ve gelişimlerini orada tamamlayarak görev yapabilecek olgun bir B hücresine farklılaşırlar.

Bahsedilen bu bilgilere rağmen B hücre biyolojisinde birçok bilinmeyen mevcuttur. Yapılacak çalışmalar vasıtasıyla özellikle kemik iliğindeki erken B hücre gelişim mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına, B hücre aracılı hastalıkların patofizyolojilerinin ortaya konmasına ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilecektir.



Şekil 2.5. Pre-BCR sinyal yolağının erken B hücre gelişimindeki rolü. Pre-BCR sinyal yolağı kemik iliğindeki erken B hücre gelişimini farklı sinyal yolaklarını aktive ederek kontrol eder (Hendriks & Middendorp, 2004)'den alınmıştır.

2.3. Hücre Zarı

2.3.1. Yapısı

Plazma zarı, hücre içi ile hücre dışı arasında koruyucu bir bariyer görevi görmektedir. Hücre zarları amfipatik özellik gösteren yani hem hidrofilik hem de hidrofobik grup taşıyan moleküler bileşenlerden oluşmaktadır. Hücre zarı çift katlı lipit katmandan ve bu katman ile etkileşim halindeki proteinlerden oluşur. Lipitler, fosfolipit, glikolipit ve kolesterollerden meydana gelmiştir (Leventis & Grinstein, 2010). Fosfolipitler genellikle endoplazmik retikulumun (ER) sitozolik kısmında eksprese

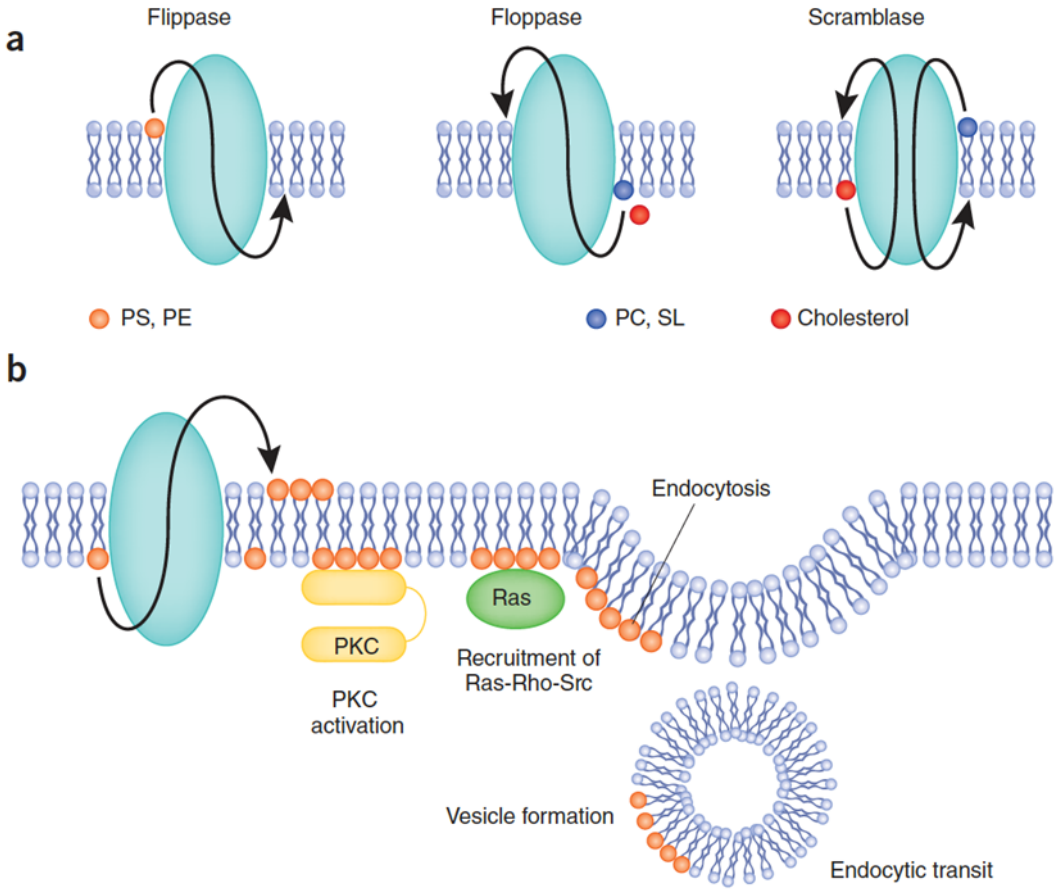
edilirler (Montigny vd., 2016). Çift katlı lipit tabakanın temel yapıtaşı fosfolipitlerdir ve hücre zarına akışkan bir form kazandırmaktadır. Zar lipitleri dinamik haldedir ve flip-flop olarak adlandırılan hareketleri sayesinde lipit çift katmanlı tabakanın bir yüzünden diğerine geçiş sağlanmaktadır (Şekil 2.6A) (Leventis & Grinstein, 2010; Nicolson, 2014; Pomorski vd., 2001; Singer & Nicolson, 1972).

2.3.2. Hücre Zarı Lipit Asimetrisi

Hücre zarını oluşturan aminofosfolipitlerin çift katman boyunca asimetrik dağılım gösterdiği bilinmektedir. Kolin içeren lipitler PC ve SM, esas olarak hücre zarının dış kısmında, amin içeren fosfolipitler PE ve PS, daha çok sitoplazmik kısma bakan iç kısmında bulunmaktadır (Goñi, 2014; Leventis & Grinstein, 2010). Bu lipit asimetrisinin sağlanması ve korunması hücrelerin canlılığı ve fonksiyonları için oldukça önemlidir. Hücre zarı lipit asimetrisinin önemi en iyi kan pıhtılaşması, apoptoz ve vezikül oluşumunda gösterilmiştir (Şekil 2.6B) (Leventis & Grinstein, 2010). Örneğin, birçok biyolojik özelliğinden dolayı PS hücre zarının iç kısmında bulunması gerekir. Çünkü PS hücre zarının iç kısmında Protein Kinaz C'yi aktive eder ve Ras, Tho ve Src gibi diğer birçok protein için bağlanma bölgesi (docking sites) oluşturur (Şekil 2.6B) (Leventis & Grinstein, 2010). Ayrıca kan pıhtılaşması sırasında PS artık plazma zarının iç kısmında kalmaz ve skramblazların da aktivitesi sonucu hücre zarının dışa bakan kısmına taşınarak kan pıhtılaşması kaskadını başlatır (Leventis & Grinstein, 2010). Yine programlanmış ölümün (apoptoz) erken safhasında PS'nin hücre zarının dış kısmında bulunması, hücrenin "ye beni (eat me)" sinyali göndermesine neden olur (Şekil 2.6B). Daha sonra bu sinyali tanıyacak reseptörlere sahip makrofajlar hücreleri tanıyıp onları yutarlar.

Hücreler için oldukça önemli olan hücre zarı lipit asimetrisinin korunmasında hücre zarı boyunca bulunan çeşitli proteinler rol oynamaktadırlar (Daleke, 2003). Plazma zarı lipit asimetrisinin oluşumunda 3 grup enzim ailesinin rol oynadığı bilinmektedir. Bunlar; flipazlar, flopazlar ve skramblazlardır (Şekil 2.6A). ATP'ye bağımlı olarak gerçekleşen taşıma işleminde flipazlar ve flopazlar görev yapar ve bu enzimler tek yönlü fosfolipit taşıması yapmaktadırlar (Şekil 2.6A). Flipazlar, PS ve PE gibi lipitleri hücre zarının dış kısmından iç kısmına taşırlar. Flopazlar ise PC ve SM gibi fosfolipitleri hücre zarının iç kısmından dış kısmına taşırlar (Şekil 2.6A). Skramblazlar

ise Ca^{2+}'a bağımlı çift yönlü taşıma yapabilir ve özellikle hücre zarı lipit asimetrisinin bozulmasında etkilidir (Şekil 2.6A). (Bevers & Williamson, 2010; Nakanishi vd., 2020; Takatsu vd., 2017).



Şekil 2.6. Hücre zarında fosfolipit taşınması. (A) Hücre zarı lipit asimetrisi 3 enzim grubu tarafından spesifik fosfolipit taşıması yapılarak sağlanır. (B) Hücre zarının iç kısmında bulunan PS önemli biyolojik fonksiyonları yerine getirir (Clark, 2011)'den alınmıştır.

Bahsedildiği gibi hücre zarı lipit asimetrisi hücreler için oldukça önemlidir ve hücre zarında bulunan çeşitli enzimlerle sağlanır. Flipazlar olarak bilinen ve hücre zarının dış kısmından iç kısmına doğru fosfolipit taşıması yapan enzimlerin P4-ATPaz ailesine ait olduğu bilinmektedir. İnsanlarda 14 ve farelerde 15 üyesi bulunan P4-ATPazların biyolojik önemleri son yıllarda yapılan çalışmalar ile ortaya çıkmaktadır. Bu taşıyıcıların immün sistem üzerindeki etkileri ise çok daha az bilinmektedir. Şimdiye

kadar P4-ATPaz üyesi olan ATP11C'nin bağışıklık sisteminin B hücreleri üzerine etkileri rapor edilmiştir. ATP11C enzimini kodlayan gendeki mutasyonlar, farelerde B hücre yetmezliğine neden olmuştur (Siggs vd., 2011; Yabas vd., 2011). Yapılan çalışmalar, kemik iliğindeki B hücre gelişiminin pro-B evresinden pre-B evresine geçiş aşamasında gelişimsel blok olduğu, bunun sonucunda mutant farelerin kemik iliği ve periferik organlarında B hücre sayısında önemli azalış olduğu gözlenmiştir (Siggs vd., 2011; Yabas vd., 2011). ATP11C defektli farelerde anemi gözlenmiş ve bu farelerin kırmızı kan hücrelerinin anormal morfolojiye sahip oldukları gözlenmiştir (Yabas vd., 2014). Yapılan fonksiyonel çalışmalar ATP11C-defektli hücrelerin kontrol hücrelere göre, hücre zarının iç kısmına daha az oranda PS ve PE gibi lipitleri taşıdıkları gösterilmiştir (Yabas vd., 2011; Yabas vd., 2014; Yabas vd., 2016). Bu sonuçlar ATP11C'nin immün sisten hücrelerinde ve diğer bazı hücrelerde majör flipaz olduğunu ortaya çıkarmıştır. Fakat ATP11C'nin fare B hücre gelişimindeki etkisinin moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca ATP11C defektli farelerde pre-B hücreleri gelişmediğinden, ATP11C'nin pre-B hücreleri üzerine etkileri de tam olarak bilinmemektedir.

Bu tez çalışmasında bir pre-B hücre hattında (WK3) *Atp11c* geni susturulmuş ve elde edilen hücreler kullanılarak ATP11C'nin pre-B hücrelerindeki flipaz aktivitesi, hücrelerin proliferasyonları ve bir sonraki evre olan olgunlaşmamış B hücrelerine farklılaşmaları üzerine olan etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Hücre Hatları

Bu tez çalışmasında SLP65-defektli fareden türetilen ve WK3 olarak isimlendirilen bir pre-B hücre hattı kullanılmıştır. SLP65, pre-BCR sinyal yolağında önemli bir adaptör protein olarak görev yapmaktadır (Flemming vd., 2003). WK3 hücrelerinin en önemli özelliklerinden biri hücrelerin IL-7 varlığında sınırsız çoğalabilmesidir (Flemming vd., 2003). Bu sınırsız çoğalmanın sebebi, bu hücrelerin yüksek düzeyde pre-BCR ifade etmeleridir (Flemming vd., 2003). WK3 hücrelerinin diğer bir özelliği ise kültürden IL-7 uzaklaştırıldığında erken B hücre gelişiminde bir sonraki evre olan IgM^+ olgunlaşmamış B hücrelerine farklılaşmalarıdır (Flemming vd., 2003).

Tez danışmanı bilimsel bir proje kapsamında ziyaret ettiği Avusturya'daki Medical University of Innsbruck'dan Dr. Sebastian Herzog'un laboratuvarında CRISPR/Cas9 sistemi ve retroviral transdüksiyon yöntemi ile *Atp11c* geni susturulan bir WK3 pre-B hücre klonu elde etmiştir. Kontrol grubunun da ATP11C-defektli hücreler ile aynı deneysel prosedüre maruz kalması için bu hücrelerde, B hücreleri için önemsiz olan *Cd8* geni susturulmuştur. Elde edilen ATP11C-defektli ve kontrol pre-B hücreleri laboratuvara getirilmiş ve bu tez çalışmasında da kullanılmıştır.

WK3 pre-B hücrelerinin besiyerine eklenmesinde kullanılan IL-7 süpernatantını elde etmek için yine Dr. Sebastian Herzog'un laboratuvarından getirilen J558L isimli hücre hattı kullanılmıştır (Flemming vd., 2003).

3.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler Ve Cihazlar

Kullanılan sarf malzemelere ait bilgiler Çizelge 3.1'de, cihazlara ait bilgiler ise Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan malzemeler

Malzeme	Üretici Firma
Fetal Bovine Serum (FBS) Premium	Cegrogen, Katalog No: A0500-4030
Penicillin-Streptomycin	Sigma, Katalog No: P0781
L-Glutamine	Sigma, Katalog No: G7513
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Sigma, Katalog No: I3390
Hanks' Balanced Salt Solution (HBBS)	Gibco, Katalog No: 14175-053
1-palmitoyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) amino]hexanoyl}-sn-glycero-3-phosphoserine (NBD-PS)	Avanti, Katalog No: 810192P
Fatty-Acid Free Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma, Katalog No: A8806
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco, Katalog No: 70011-036
PE Cyanine7 konjuge anti-mouse IgM (Klon: RMM-1)	Biolegend, Katalog No: 406514
FITC konjuge anti-mouse Ig light chain	Biolegend, Katalog No: 409509

kappa (Klon: RMK-45)	
Sytox Red Dead Cell Stain	Thermofisher, Katalog No: S34862
Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)	Thermofisher, Katalog No: C34554
%0,4 Trypan Blue solution	Sigma, Katalog No: T8154
6-Kuyucuklu plastik plate'ler	Nest, Katalog No: 703001
96-Kuyucuklu plastik plate'ler	Nest, Katalog No: 701101
75 cm^2'lik Kültür flaskları	Nest, Katalog No: 708003

Çizelge 3.2. Kullanılan cihazlar

Cihaz	**Marka**
Karbondioksitli inkübatör	Heal Force
Vorteks	Biosan Vortex
İnverted mikroskop	Motic
Biyolojik emniyet kabini, Class II, A2	Alpina
Flow sitometri	Attune Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems)
Soğutmalı mikrosantrifüj	Gyrozen, 1730R
Masaüstü soğutmalı santrifüj	Gyrozen, 624R

3.2. Metot

3.2.1. WK3 Hücrelerinin Kültürü

WK3 pre-B hücreleri IL-7 varlığında sınırsız olarak çoğalabilir ve IL-7'nin ortamdan uzaklaştırılması sonrasında yüzeyinde IgM ifade eden olgunlaşmamış B hücrelerine farklılaşırlar (Flemming vd., 2003). *Atp11c* geni susturulan klon (ATP11C-defektli) hücreler ve *Cd8* geni susturulan (kontrol) hücreler uygun standart protokolde çözdürülerek kültür edilmiş ve bu çalışmada kullanılmıştır.

WK3 hücreleri %7,5 FBS Premium, %1 Penicillin-Streptomycin, %1 L-Glutamine ve 50µM 2-Mercaptoethanol içeren IMDM medyumu içinde 37^{o}C ve %5 CO_2 içeren ortamda 6-kuyucuklu plate'ler içerisinde çoğaltılmıştır. Besiyeri içerisine J558L hücrelerinin kültürlenmesi sonrasında elde edilen ve yüksek miktarda IL-7 içeren süpernatant da eklenmiştir. Hücrelerin büyümeleri mikroskop ile kontrol edilip her 2-3 günde pasajlama yapılmıştır.

WK3 hücrelerinin besiyerlerinde kullanılan IL-7 süpernatantını elde etmek için J558L hücreleri %10 FBS, %1 Penicillin-Streptomycin, %1 L-Glutamine içeren RPMI 1640 medyumu içerisinde 37^{o}C ve %5 CO_2 içeren ortamda 75 cm^2'lik flaskların içerisinde çoğaltılmıştır. Daha sonra sıvı kısım toplanarak filtrelenip WK3 hücre medyumunda kullanılmak üzere -20^{o}C'de saklanmıştır. Bu çalışmada, daha önce tez danışmanı tarafından hazırlanan ve -20^{o}C'de saklanan IL-7 süpernatantı kullanılmıştır.

3.2.2. Flipaz Aktivitesinin Testi

Flipaz aktivitesinin testi için kültürü yapılan 10^5 ATP11C-defektli ve kontrol hücresi;

- 2mL`lik plastik tüplere aktarılmıştır.
- Hücreler, bir kez 1.5mL 1mM $MgCl_2$ ve 2mM $CaCl_2$ içeren HBSS ile yıkanıp 1500rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- Hücreler, 200µL 1mM $MgCl_2$ ve 2mM $CaCl_2$ içeren HBSS içerisinde PS analoğu olan NBD-PS ile 2µM final konsantrasyonda 15^{o}C'de 20 dakika boyunca inkübe edilmiştir.

- İnkübasyon sonrası hücreler hemen buz içerisine alınarak içeri taşınmayan NBD-PS'lerin uzaklaştırılması için 500µL %1'lik yağ-asitsiz (fatty acid-free) BSA eklenerek 5 dakika daha buz içerisinde inkübe edilmiştir.
- Hücrelere 1mL 1mM $MgCl_2$ ve 2mM $CaCl_2$ içeren HBBS eklenerek 1500rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- Hücreler, tekrar 500µL %1'lik yağ-asitsiz BSA içeren HBBS'de 5 dakika buz içerisinde inkübe edilmiştir.
- Hücrelere 1mL 1mM $MgCl_2$ ve 2mM $CaCl_2$ içeren HBBS eklenerek 1500rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- Hücreler, 1.5mL flow sitometri solüsyonu (%2 FBS içeren PBS) ile yıkanıp 1500rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- Örnekler flow sitometri solüsyonu içerisinde resüspanse edilip buzda bekletilerek Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezinde bulunan Attune Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems) cihazında analiz edilmiştir.

3.2.3. CFSE İşaretlemesi İle Proliferasyon Testi

WK3 pre-B hücrelerinin IL-7`ye bağımlı proliferasyonlarının tespiti için CFSE ile işaretleme sonrası flow sitometri cihazında analiz yöntemi kullanılmıştır (Quah & Parish, 2012). Yaklaşık 10^5 ATP11C-defektli ve kontrol hücresi;

- 15mL falkon tüp içerisinde, IL-7 içermeyen fakat diğer tüm bileşenleri içeren 5mL medyum ile yıkanıp 1500rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- Hücreler, aynı medyum içerisinde son konsantrasyonu 10µM olan CFSE ile oda sıcaklığında 10 dakika işaretlenmiştir.
- Hücreler, daha sonra 3 kez 5mL aynı medyum ile yıkanarak 1500rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- Hücreler, 6-kuyucuklu plate'lerde IL-7 içeren medyumda inkübe edilmiştir.
- İnkübasyondan 24, 48 ve 72 saat sonra, hücreler U-tabanlı 96-kuyucuklu plate'lere aktarılmıştır.
- 1500rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır.

- Hücreler, 200µL flow sitometri solüsyonu ile yıkanıp 1500rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- Hücreler, flow sitometri solüsyonu içerisinde SYTOX Red Dead Cell Stain ile üreticinin tavsiye ettiği oranda (son konsantrasyon 5nM), 15-20 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta boyanmıştır.
- Örnekler boyama sonrası flow sitometri solüsyonu içerisinde buzda bekletilerek Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezinde bulunan Attune Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems) cihazında analiz edilmiştir.

3.2.4. Pre-B Hücrelerinin Igκ$^+$Igm$^+$ Olgunlaşmamış B Hücrelerine Farklılaşmanın Test Edilmesi

WK3 pre-B hücrelerinin IL-7'siz bırakıldıklarında Igκ$^+$IgM$^+$ olgunlaşmamış B hücrelerine farklılaşmalarının testi için 5x10^5 ATP11C-defektli ve kontrol hücresi;

- IL-7 içermeyen fakat diğer tüm bileşenleri içeren medyumda 48 saat inkübe edilmiştir.
- 48 saat sonra hücreler U-tabanlı 96-kuyucuklu plate'lere aktarılmıştır.
- Hücreler, 1500rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- Hücreler, 200µL flow sitometri solüsyonu ile yıkanıp yeniden 1500rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantlar uzaklaştırılmıştır.
- Hücreler, üreticinin tavsiye ettiği dilüsyonda 50µL PE-Cyanine7 konjuge anti-mouse IgM, FITC konjuge anti-mouse Ig light chain kappa ve SYTOX Red Dead Cell Stain karışımı ile 30 dakika buz içerisinde boyanmıştır.
- İnkübasyon sonrası, hücrelere 150µL flow sitometri solüsyonu eklenerek yıkanmış, 1500rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantlar uzaklaştırılmıştır.
- Boyama sonrası hücreler, flow sitometri solüsyonu içerisinde buzda bekletilerek Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezinde bulunan Attune Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems) cihazında analiz edilmiştir.

Flow sitometri cihazında elde edilen veriler FlowJo (Tree Star) programı kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.5. İstatistiksel Analiz

Örneklerin istatistiksel analizlerinde GraphPad Prism 5 programı kullanılarak The Mann-Whitney testi uygulanmış ve P değeri 0,05'den küçük olduğu durumlarda istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu kabul edilmiştir. Bu tezde verilen grafikler GraphPad Prism 5 programı kullanılarak çizilmiştir.

BÖLÜM 4

BULGULAR

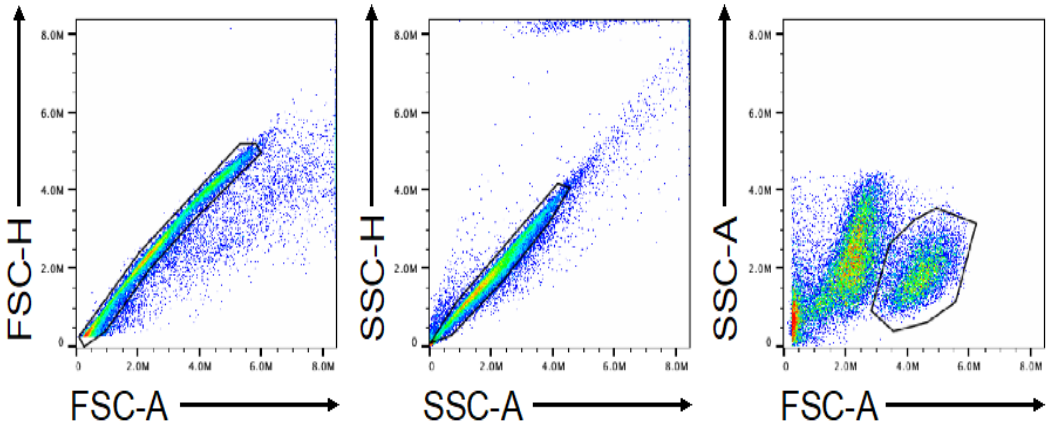
4.1. ATP11C Eksikliği Pre-B Hücrelerinde Defektli Flipaz Aktivitesine Neden Olur

ATP11C-defektli pre-B hücrelerde *Atp11c* ve kontrol hücrelerde ise *Cd8* genleri CRISPR/Cas9 ve retroviral transdüksiyon metotları kullanılarak susturulmuş ve bu tez çalışmasında kullanılan hücre klonları elde edilmiştir. Daha sonra hücrelerden genomik DNA'lar izole edilmiş ve hedef diziyi de içeren bir primer çifti ile PCR yapılarak *Atp11c*'nin susturulduğu kontrol edilmiştir. Tez danışmanının yapmış olduğu bu deneylerde defektli hücrelerde *Atp11c* geninin başarılı bir şekilde susturulduğu kanıtlanmıştır.

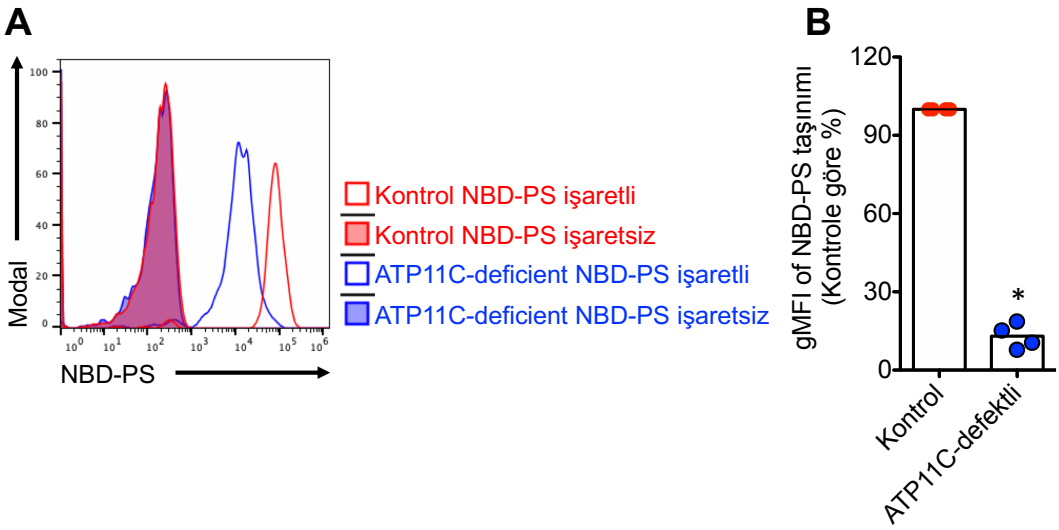
Her ne kadar *Atp11c*'nin başarılı bir şekilde susturulduğu PCR ile gösterilse de hücrelerde ATP11C ekspresyonunun olmadığı protein seviyesinde de gösterilmek istenmiştir. Bunun için tez danışmanı tarafından ATP11C antikoru ile western blotlama yapılmış, fakat hem ATP11C-defektli hem de kontrol hücrelerinde ATP11C ekspresyonu gözlenmemiştir. Pozitif kontrol için kullanılan ve ATP11C'nin yüksek oranda ekspresyonu olduğu bilinen karaciğer örneğinde ATP11C ekspresyonu gözlenmiştir. Bu sonuçlar bize western blotlama deneyinin çalıştığını, fakat pre-B hücrelerinde ATP11C ekspresyonunun muhtemelen kullanılan antikor ve yapılan western blotlama ile tespit edilebilecek seviyeden daha az bir seviyede olabileceğini ileri sürmüştür. Daha önce yapılan çalışmalarda farklı hücrelerde farklı ATP11C ekspresyonunun gözlenmesi bu düşünceyi desteklemektedir (Jing vd., 2019).

Önceki yıllarda yapılan çalışmalar, ATP11C eksikliği olan çeşitli hücrelerin azalmış flipaz aktivitesine sahip olduğunu ve kontrol hücrelerine göre hücre zarının dış kısmından iç kısmına doğru daha az PS translokasyonu yapabildiklerini göstermiştir (Segawa vd., 2014; Takatsu vd., 2014; Yabas vd., 2014; Yabas vd., 2016; Yabas vd., 2011). Dolayısıyla bu tez çalışmasında ilk olarak ATP11C-defektli ve kontrol hücrelerde flipaz aktivitesi test edilmiş böylece hücreler fonksiyonel bakımdan test edilmiştir. Bunun için ATP11C-defektli ve kontrol hücreler PS analoğu olan NBD-PS ile 15^{o}C'de 20 dakika boyunca muamele edilmiş ve yıkama sonrası flow sitometri cihazında analiz edilmiştir. Hücrelerin NBD-PS ile 15^{o}C'de muamele edilmesinin sebebi endositoz yoluyla spesifik olmayan fosfolipitlerin hücre zarının iç kısmına taşınmasını minimize etmektir. Elde edilen veriler FlowJo programı kullanılarak analiz edilmiştir. (Şekil 4.1)'de gösterilen flow sitometrik analizde hücreler ilk önce FSC-H vs FSC-A ve SSC-H vs SSC-A profillerine göre kapılanmış ve bu sayede sadece singlet (tekli) hücrelerde analizler yapılmıştır. Seçilen bu hücreler içerisinde daha sonra SSC-A vs FSC-A profillerine göre pre-B hücreleri seçilmiş ve bu hücrelerde NBD-PS analizi yapılmıştır (Şekil 4.1).

Hücreler flipaz aktivitesi bakımından karşılaştırıldığında ATP11C-defektli pre-B hücrelerinde flipaz aktivitesinin kontrol hücrelerine göre yaklaşık %87 oranında azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.2). Bu sonuçlar daha önce ATP11C-defektli farelerden elde edilen immün sistem hücreleri ve ATP11C-defektli çeşitli hücre hatları ile yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar ile oldukça benzerdir (Segawa vd., 2014; Takatsu vd., 2014; Yabas vd., 2014; Yabas vd., 2016; Yabas vd., 2011). Dolayısıyla PCR sonuçlarına ilave olarak, CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak WK3 pre-B hücre hattında *Atp11c* geninin başarılı bir şeklide susturulduğu fonksiyonel olarak da kanıtlanmıştır. Ayrıca sonuçlarımız literatürde ilk kez diğer majör immün sistem hücreleri gibi (Yabas vd., 2016), pre-B hücrelerinin de hücre zarındaki flipaz aktivitesi için yüksek oranda ATP11C'ye bağımlı olduğunu ortaya çıkarmıştır. Pre-B hücrelerindeki ATP11C eksikliği bu hücrelerde defektli flipaz aktivitesine neden olmuştur.



Şekil 4.1. Flipaz aktivitesinin testi için uygulanan kapılama stratejisi. Flow sitometri cihazında test edilen örneklerden elde edilen veriler FlowJo programı kullanılarak analiz edilmiştir. Hücreler ilk önce FSC-H (Forward scatter-Height) vs FSC-A (Forward scatter-Area) (soldaki panel) ve SSC-H (Side scatter-Height) vs SSC-A (Side scatter-Area) (ortadaki panel) profillerine göre kapılanmış ve bu sayede sadece singlet (tekli) hücreler seçilmiştir. Daha sonra bu hücrelerde SSC-A vs FSC-A (sağdaki panel) profillerine göre pre-B hücreleri seçilmiş ve seçilen bu hücrelerde Şekil 4.2'deki gibi NBD-PS analizi yapılmıştır.



Şekil 4.2. ATP11C-defektli pre-B hücreler azalmış flipaz aktivitesine sahiptir. (A) Şekil 4.1'de gösterildiği gibi seçilen ve NBD-PS ile işaretlenen kontrol (kırmızı çizgi) ve ATP11C-defektli (mavi çizgi) hücrelerin NBD-PS overlay histogram analiz örneği verilmiştir. NBD-PS ile işaretlenmeyen kontrol (kırmızı içi dolu) ve ATP11C-defektli (mavi içi dolu) hücrelerde herhangi bir flipaz aktivitesi gözlenmemiştir. (B) Grafik, panel (A)'da gösterildiği şekilde analizi yapılan hücrelerdeki NBD-PS'nin geometrik mean fluorescence intensity (gMFI)'sini göstermektedir. Verilerde ATP11C-defektli hücrelerden elde edilen sonuçlar kontrol grubuna göre oranlanmıştır. Grafikteki veriler birbirinden bağımsız olarak yapılan 4 farklı deneyden elde edilen sonuçların birleşimidir.

4.2. ATP11C Kaybı Pre-B Hücrelerinin IL-7'ye Bağımlı Proliferasyonlarını Etkilemez

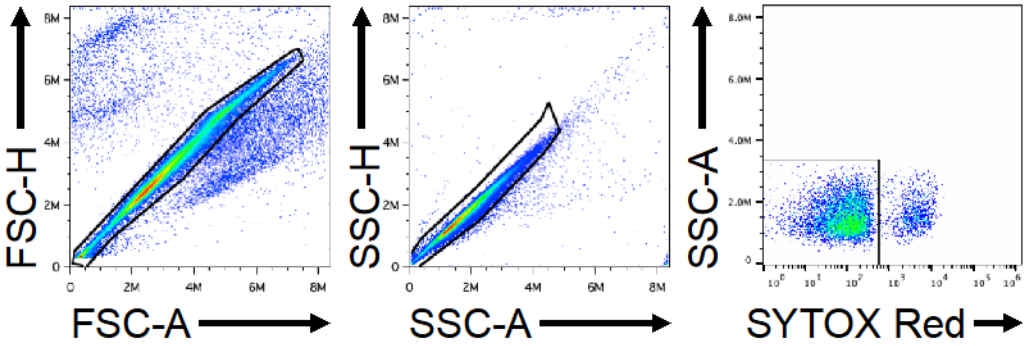
WK3 pre-B hücre hattının en önemli özelliklerinden biri IL-7'ye bağlı sınırsız olarak çoğalmasıdır (Flemming vd., 2003). ATP11C'nin pre-B hücrelerinin IL-7'e bağlı proliferasyonu üzerinde herhangi bir etkisinin olup olmadığının test edilmesi için eşit sayıdaki ATP11C-defektli ve kontrol hücresi, lenfosit proliferasyon boyası CFSE ile işaretlenip yüksek miktarda IL-7 içeren medyumlarda 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. IL-7'e bağımlı olarak meydana gelen pre-B hücre proliferasyonları, CFSE'nin her bölünme sonrasında dilue olması özelliği vasıtasıyla test edilmiştir (Quah & Parish, 2012).

İnkübasyondan 24, 48 ve 72 saat sonra elde edilen veriler FlowJo programı kullanılarak analiz edilmiştir. Şekil 4.3'de gösterilen örnek analizde hücreler ilk önce singlet (tekli) hücreler seçilmiştir. Hücre kültürü ve hücrelerin boyanması sırasında oluşabilen ve sonuçların yanlış yorumlanmasına neden olabilecek ölü hücreler bulunmaktadır. Dolayısıyla analiz yapılırken ölü hücrelerin, analizi yapılacak canlı hücrelerden ayrıştırılması gerekir. Bu nedenle hücreler SYTO Red Dead Cell Stain ile boyanmış ve SYTO Red Dead Cell Stain pozitif olan hücreler ayrıştırılarak sadece canlı pre-B hücreler seçilmiştir (Şekil 4.3). Ölü hücrelerin analiz dışında bırakılmasından sonra kontrol hücreleri ile ATP11C-defektli pre-B hücreleri CFSE markırı açısından histogramları üst üste gelecek şekilde analiz edilmiştir (Şekil 4.3).

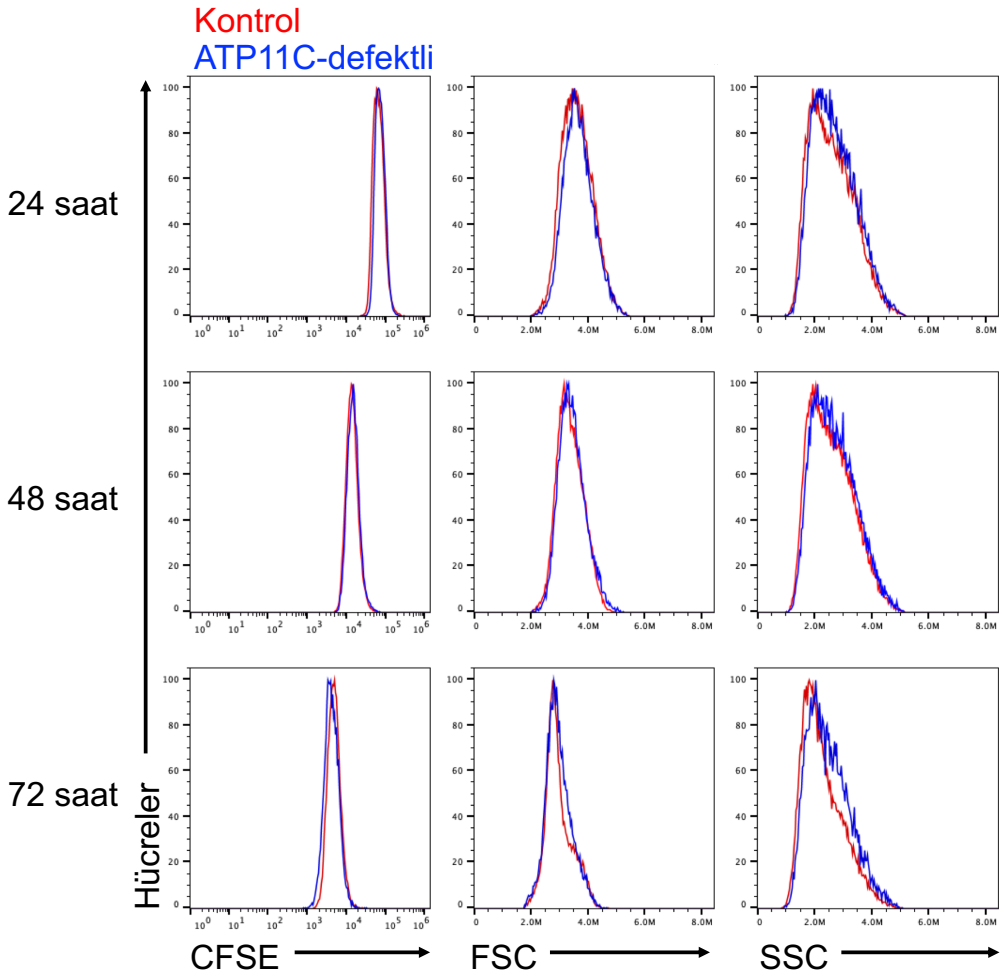
Yapılan analizler sonucu CFSE boyasının floresan yoğunluğu analiz yapılan her gün sola doğru hareketlenmiş, dolayısıyla hücrelerin prolifere olduğu doğrulanmıştır (Şekil 4.4). Karşılaştırmalı yapılan analizde ise ATP11C-defektli hücrelerinin IL-7'ye bağımlı olan proliferasyon yeteneklerinin kontrol hücrelerine benzer olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4). Gözlenen bu benzerlik analiz yapılan 24, 48 ve 72 saat denemelerinde de gözlenmiştir (Şekil 4.4). Ayrıca hücrelerin büyüklükleri hakkında bilgi veren FSC analizi ve hücrelerin içerikleri (granüliteleri) hakkında bilgi veren SSC analizi de yapılmış ve CFSE sonuçlarına benzer olarak kontrol ve ATP11C-defektli hücreler arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.4).

Bu sonuçlar ATP11C-defektli hücrelerin yüksek miktardaki IL-7 varlığında normal bir şekilde prolifere olduğunu, dolayısıyla kullandığımız sistemde ATP11C'nin

pre-B hücrelerinin IL-7'ye bağımlı proliferasyonları üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını ileri sürmüştür.



Şekil 4.3. Proliferasyon ve farklılaşma deneylerinin analizi için kapılama strateji. Flow sitometri cihazında test edilen örneklerden elde edilen veriler FlowJo programı kullanılarak analiz edilmiştir. Hücreler ilk önce FSC-H (Forward Scatter-Height) vs FSC-A (Forward Scatter-Area) (soldaki panel) ve SSC-H (Side Scatter-Height) vs SSC-A (Side Scatter-Area) (ortadaki panel) profillerine göre kapılanmış ve bu sayede sadece singlet (tekli) pre-B hücreleri seçilmiştir. Daha sonra bu hücrelerde SSC-A vs SYTOX Red (sağdaki panel) profillerine göre analiz yapılmış ve sadece SYTOX Red^{-} canlı pre-B hücreleri seçilmiştir. Son olarak seçilen bu hücrelerde CFSE (Şekil 4.4) veya Igκ ve IgM (Şekil 4.5) profillerine göre analiz yapılmıştır.



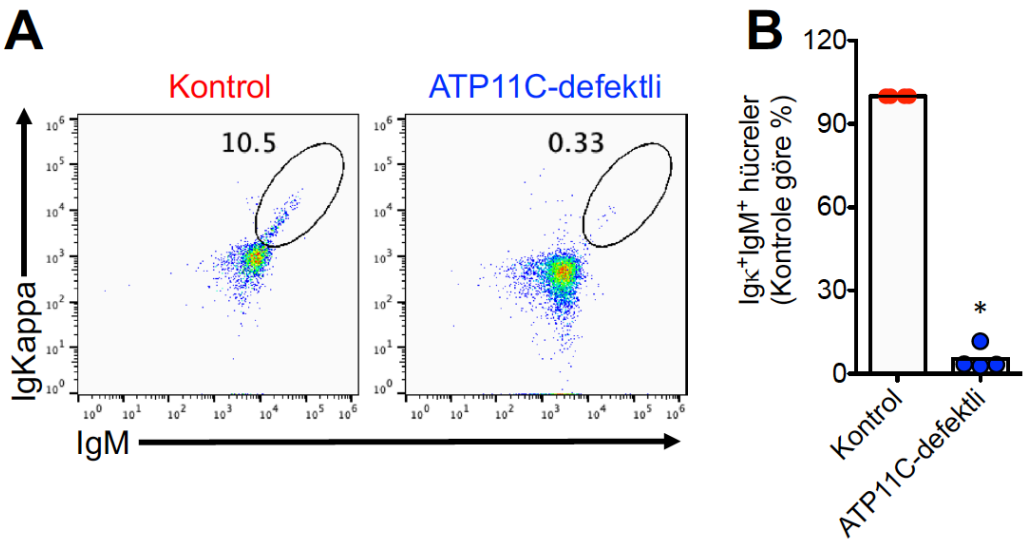
Şekil 4.4. WK3 pre-B hücrelerinde ATP11C eksikliği hücrelerin IL-7'ye bağlı proliferasyonlarını etkilemez. Hücreler yüksek miktarda IL-7 içeren medyumda 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra Şekil 4.3'de gösterildiği gibi seçilen canlı kontrol (kırmızı çizgi) ve ATP11C-defektli (mavi çizgi) pre-B hücrelerde CFSE, FSC (Forward scatter) ve SSC (Side scatter) profillerine göre analiz yapılmıştır. Sonuçlar her birinde 3 farklı örnek olan ve birbirinden bağımsız olarak yapılan 4 farklı deneyden elde edilen sonuçlardan birini göstermektedir.

4.3. ATP11C Eksikliği WK3 Pre-B Hücrelerinin $Ig\kappa^{+}IgM^{+}$ Olgunlaşmamış B Hücrelerine Farklılaşmalarını Etkiler

Daha önce bahsedildiği gibi bu çalışmada kullanılan WK3 pre-B hücrelerinin en önemli özelliklerinden biri de IL-7 uzaklaştırıldığı zaman pre-B hücrelerinden olgunlaşmamış B hücrelerine farklılaşmasıdır (Flemming vd., 2003). ATP11C'nin bu farklılaşma sürecinde herhangi bir rolünün olup olmadığını test etmek için eşit sayıdaki

kontrol ve ATP11C-defektli pre-B hücreleri IL-7 içermeyen medyum içerisinde 48 saat inkübe edilmiştir. Olgunlaşmamış B hücreleri yüzeylerinde Igκ ve IgM ifade ettiğinden, 48 saat IL-7'siz ortamda inkübe edilen hücrelerde Igκ ve IgM analizleri yapılmıştır. Elde edilen veriler FlowJo programı kullanılarak analiz edilmiş ve Şekil 4.3'de gösterilen örnek analizdeki gibi canlı hücreler seçilmiş ve daha sonra bu hücrelerde $Igκ^+IgM^+$ olgunlaşmamış B hücreler tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre yaklaşık %10 kontrol pre-B hücresi IL-7'siz ortamda kültür edildiğinde yüzeylerinde hem Igκ hem de IgM eksprese ederek olgunlaşmamış B hücrelerine farklılaşmaktadırlar (Şekil 4.5). Dikkat çekici bir şekilde ATP11C-defektli hücrelerin analizleri bu hücrelerin IL-7'siz bırakıldıklarında olgunlaşmamış B hücrelerine farklılaşamadıklarını göstermiştir (Şekil 4.5). Bu sonuçlar ATP11C'nin pre-B hücrelerinin IgM^+ olgunlaşmamış B hücrelerine farklılaşmaları üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.5. ATP11C-defektli WK3 pre-B hücreleri IL-7'sız bırakıldıklarında $Igκ^+IgM^+$ olgunlaşmamış B hücrelerine farklılaşmada başarısız olurlar. (A) Şekil 4.3'de gösterildiği gibi seçilen kontrol ve ATP11C-defektli pre-B hücrelerde Igκ ve IgM profillerine göre analiz yapılmış ve $Igκ^+IgM^+$ hücreler olgunlaşmamış B hücreleri olarak belirlenmiştir. Sayılar, kapılaması yapılan kısımdaki hücrelerin yüzdesini ifade etmektedir. (B) Grafik panel (A)'da gösterildiği şekilde analizi yapılan ATP11C-defektli hücrelerin kontrol grubuna oranını göstermektedir. Veriler birbirinden bağımsız olarak yapılan 3 farklı deneyden elde edilen 4 farklı örnekten elde edilmiştir.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Bağışıklık sistemi canlıyı çevresindeki enfeksiyon ajanlarına karşı koruyan bir sistemdir ve doğal bağışıklık ve edinsel bağışıklık olmak üzere iki koldan oluşur (Janeway, 1999). Edinsel bağışıklık, hücresel elemanları T ve B hücreleri vasıtasıyla patojenlere karşı daha spesifik immün yanıtlar oluşturmada oldukça önemlidir (Janeway, 1999). T hücreleri timüste gelişirken B hücreleri memeli kemik iliğinde gelişip olgunlaşmalarını sekonder lenfoid organlarda tamamladıktan sonra dolaşım sistemi vasıtasıyla tüm vücuda yayılır (Janeway, 1999). Üzerinde taşıdıkları reseptörleri (BCR) vasıtasıyla tanıyabilecekleri antijenler ile karşılaştıklarında aktive olurlar ve bir dizi biyokimyasal sinyaller neticesinde antikor üreten plazma B hücrelerine farklılaşarak organizmayı enfeksiyon ajanlarına karşı farklı mekanizmalar ile korurlar (Nutt & Kee, 2007). Bu özellikleri sayesinde B hücreleri canlılar için oldukça önemlidir ve B hücre gelişiminin incelenmesi, enfeksiyon ajanlarına karşı verilen B hücre aracılı yanıtların daha iyi anlaşılmasına ve B hücre odaklı çeşitli tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunacaktır.

Yıllar önce insan eritrositlerinde yapılan çalışmalar, ökaryotik plazma membranlarının çift tabakalı (bilayer) ve asimetrik olarak dağılım gösteren aminofosfolipitlerden oluştuğunu ortaya çıkarmıştır (Gordesky & Marinetti, 1973). Bu fosfolipitlerden PC ve SM dış kısımda bulunurken PS ve PE daha çok iç kısımda bulunmaktadır (Bretscher, 1972; Gordesky & Marinetti, 1973). Hücre zarlarındaki lipit

asimetrisinin oluşması ve dinamik bir şekilde devamının sağlanması hücrelerin canlılığı ve fonksiyonları açısından oldukça önemlidir (Leventis & Grinstein, 2010). Özellikle PS'nin hücrenin içe bakan sitoplazmik kısımda bulunması hücreler için oldukça önemlidir, zira iç kısımda bulunan PS birçok biyolojik fonksiyonu yerine getirmektedir. Örneğin, PS iç kısımda PKC beta aktivasyonunu sağlar ve Ras, Rho gibi diğer yolaklarda önemli rolleri olan proteinler için bağlanma bölgeleri (docking site) oluşturur (Leventis & Grinstein, 2010). Dahası trombositlerin aktivasyonları sırasında skramblazların aktivitesi sonucu PS'ler hücre zarının dış kısmına taşınırlar ve kan pıhtılaşma kaskadının başlatılmasında önemli rol oynarlar (Lentz, 2003). PS'nin en önemli rollerinden birisi de apoptotik hücrelerin tanınması ve apoptoza uğrayacak olan hücrelerin temizlenmesindeki görevidir (Nagata & Segawa, 2021). Ölüm yoluna giren bir hücrenin erken döneminde, PS artık hücre zarının iç kısmında kalmaz, flipaz inaktivasyonu ve skramblaz aktivitesi sonucu hücre dışında birikerek PS-tanıyan reseptörler taşıyan makrofajlar gibi ölü hücreleri yutan hücrelere "ye beni (eat me)" sinyali sağlarlar. Bu hücreler daha sonra yutulup ortamdan temizlenirler.

Hücre zarı lipit asimetrisinin oluşması ve dinamik bir şekilde devamının sağlanması, hücre zarında gömülü olan üç grup enzim tarafından sağlanır. Flopaz adı verilen enzimler PC gibi lipitleri hücre zarının iç kısmından dış kısmına taşırken, flipaz adı verilen P4-tip ATPazlar PS ve PE gibi aminofosfolipitleri hücre zarının dış kısmından iç kısmına ATP'ye bağımlı olarak taşırlar (Shin & Takatsu, 2022; van der Mark vd., 2013). Üçüncü enzim grubu olan skramblazlar ise Ca^{+2}'ye bağımlı olarak görev yaparlar ve her iki yöne de lipit taşıyabilirler (Bevers & Williamson, 2010). Biyolojik önemlerine rağmen flopazlar, flipazlar ve skramblazların özellikle immün sistem hücrelerinin gelişimleri ve fonksiyonları açısından önemleri hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır.

Yakın zamanda, flipaz ailesinden olan ve ATP11C adı verilen bir enzimin hücre zarında flipaz aktivitesine sahip olduğu ve hücre zarının dış kısmından iç kısmına doğru özellikle PS ve PE taşıdığı ortaya konulmuştur (Segawa vd., 2014; Takatsu vd., 2014; Yabas vd., 2014; Yabas vd., 2016; Yabas vd., 2011). İmmünolojik olarak ATP11C eksikliği farelerde B hücre yetmezliğine neden olmuştur (Siggs vd., 2011; Yabas vd., 2011). ATP11C mutant farelerin hem kemik iliğinde hem de sekonder lenfoid organlarında B hücre sayıları, kontrol farelere göre önemli ölçüde azalmıştır (Siggs vd.,

2011; Yabas vd., 2011). Detaylı yapılan çalışmalar ATP11C'nin fare B hücrelerinin kemik iliğindeki pro-B gelişim evresinden pre-B evresine geçişini kontrol ettiğini ve mutant farelerin pre-B hücre sayılarında önemli ölçüde azalma olduğunu ortaya koymuştur (Siggs vd., 2011; Yabas vd., 2011). Bu sonuçlara rağmen ATP11C'nin erken B hücrelerinin gelişimlerini mekanistik olarak nasıl kontrol ettiği tam olarak bilinmemektedir. ATP11C'nin fonksiyonu göz önünde bulundurulduğunda ATP11C eksikliğinde hücre zarı dışında PS birikmesi olabileceği için akla gelen ilk mekanistik hipotez, ATP11C yokluğunda hücre zarının dış yüzeyinde PS biriken pro-B ve/veya pre-B hücreler makrofajlara "ye beni (eat me)" sinyali gönderir ve bu hücreler makrofajlar tarafından yutulur. Sonuç olarak mutasyonlu farelerde pre-B hücre sayısında azalma ve dolayısıyla B hücre yetmezliği ortaya çıkar. Yakın zamanda yapılan bir çalışmadan elde edilen sonuçlar bu hipotezi kısmen desteklemektedir. Bu çalışmada ATP11C-defektli farelerin, dış yüzeyinde PS bulunduran daha fazla hücreye sahip olduğu raporlanmıştır (Segawa vd., 2018). Ayrıca ATP11C mutasyonlu farelerde görülen B hücre eksikliği, bu farelerin $MerTK^{-/-}Axl^{-/-}$ ile çiftleştirilmesiyle elde edilen üçlü (triple) knock out farelerde kısmen de olsa düzelmiştir (Segawa vd., 2018). MerTK ve Axl, PS reseptörü olarak görev yaptıkları için $ATP11C^{-/y}MerTK^{-/-}Axl^{-/-}$ farelerdeki hücrelerin dış yüzeylerinde bulunan PS'ler makrofajlar tarafından tanınmaz ve yutulmazlar. Bunun sonucunda da ATP11C-defektli farelerin fenotiplerinde düzelmeler gözlenmektedir (Segawa vd., 2018). Fakat B hücre sayılarında gözlemlenen düzelmelerin kısmi olması ve anemi ve kolestaz gibi ATP11C-defektli farelerde görülen fenotiplerin $MerTK^{-/-}Axl^{-/-}$ eksiklikleri vasıtasıyla düzeltilememiş (Segawa vd., 2018). ATP11C-defektli farelerde gözlemlenen fenotiplerin farklı nedenlerinin de olabileceğini ileri sürmektedir.

IL-7R sinyal yolağı farelerde erken B hücre gelişiminde önemli bir role sahiptir (Barata, vd., 2019). ATP11C-defektli farelerin erken B hücre gelişiminde problem gözlenmesi, ATP11C'nin IL-7R sinyal yolağı üzerinde bir rolü olabileceği fikrini akıllara getirmektedir. Fakat $Il7^{-/-}$ veya $Il7r^{-/-}$ farelerde yapılan çalışmalar, bu farelerin B hücrelerindeki gelişimsel problemin ATP11C-defektli farelerde gözlemlenen problemden bir evre önce olduğunu göstermiştir (Peschon vd., 1994; von Freeden-Jeffry vd., 1995). $Il7^{-/-}$ ve $Il7r^{-/-}$ farelerde pre/pro-B evresinde gelişimsel problem varken (Peschon vd., 1994; von Freeden-Jeffry vd., 1995), ATP11C-defektli farelerde pro-B

evresinden pre-B evresine geçişte problem bulunmaktadır (Siggs vd., 2011; Yabas vd., 2011). Yine ATP11C-defektli farelerden izole edilen pro-B hücrelerinin daha fazla IL-7Rα (CD127) ekspresyonuna sahip olduğu ve yüksek miktardaki IL-7 ile kültür edilmesi sonucu normal hücreler ile benzer proliferasyona sahip olduğu gözlemlenmiştir (Yabas vd., 2011). Dahası ATP11C mutasyonlu pro-B hücrelerinin IL-7 stimülasyonundan sonra kontrol hücrelerine benzer şekilde IL-7R downstream molekülü olan STAT5 fosforilasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Yabas, 2014). Bu tez çalışmasında ise ATP11C-defektli bir pre-B hücre hattı kullanılarak yapılan deneyler, bu hücrelerin de yüksek miktardaki IL-7 varlığında normal bir şekilde prolifere olabildiğini göstermiştir. Dolayısıyla diğer sonuçlarla birlikte bu tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar, ATP11C'nin IL-7 ile indüklenen pro-B ve pre-B hücrelerinin proliferasyonları üzerine direkt olarak bir etkisinin olmadığını ileri sürmektedir.

Pre-B hücrelerinin gelişimi için önemli olan diğer bir yolak ise pre-BCR sinyal yolağıdır (Herzog vd., 2009). Hem farelerde hem de insanlarda yapılan çalışmalar, pre-BCR oluşumunun veya sinyalizasyonun gerçekleşmediği durumlarda B hücre gelişiminin pre-B hücre evresinde durduğunu ve B hücre yetmezliğinin ortaya çıktığını raporlamıştır (Gong & Nussenzweig, 1996; Kitamura vd., 1992; Kitamura vd., 1991; Mundt vd., 2001). Dolayısıyla, ATP11C mutant farelerdeki B hücre yetmezliğinin (Siggs vd., 2011; Yabas vd., 2011), pre-BCR defektli faredekilere benzer olması, ATP11C'nin pre-B hücre gelişimi için elzem olan pre-BCR sinyal yolağı üzerine bir etkisi olabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır. Daha önce yapılan çalışmalar anti-Igβ antikor stimülasyonunun *Rag1*$^{-/-}$ farelerde CD25^{+} pre-B hücre oluşumunu ve hücre içi Ca^{+2} salınımını tetiklediğini, fakat *Rag1*$^{-/-}$*Atp11c*$^{amb/0}$ çift (double) knock out farelerde buna benzer bir etki göstermediğini raporlamıştır (Yabas, 2014). Anti-Igβ antikor stimülasyonuna verilecek cevabın pre-BCR yolağına bağımlı olması, ATP11C'nin fare kemik iliğindeki pre-BCR sinyal yolağı üzerinde etkisinin olabileceği fikrini desteklemektedir.

Peki ATP11C pre-BCR sinyal yolağını nasıl etkileyebilir? Her ne kadar olgun BCR ile pre-BCR arasında yapısal benzerlikler olsa da sinyal yolaklarının nasıl aktive olduğu iki reseptör açısından farklıdır. Olgun BCR antijenine bağlandıktan sonra aktive olurken pre-BCR'lerin ER'de bir araya gelmesi ve hücre yüzeyindeki ekspresyonu

yolağın aktive olması için yeterli olduğu düşünülmektedir (Clark vd., 2014; Herzog vd., 2009; Reth & Nielsen, 2014). Fakat bu görüşten farklı olarak pre-BCR aktivasyonu için de soluble bir liganda ihtiyaç duyulduğu ileri sürülmüştür (Bradl & Jäck, 2001; Gauthier vd., 2002). Bir diğer görüşe göre ise pre-BCR'lerin hücre yüzeyinde toplanıp bir araya gelmesi aktivasyon için yeterlidir (Ohnishi & Melchers, 2003). Bu ihtimaller doğrultusunda pre-BCR'nin hücre yüzeyinde ekspresyonu ve/veya aktive olması için özel hücre zarı lipit kompozisyonu gerekebilir. ATP11C eksikliğinde hücre zarı lipit asimetrisi bozulduğundan pre-BCR ekspresyonu ve/veya aktivasyonu etkilenmiş olabilir. Bunun sonucunda da pre-BCR sinyal yolağı eksikliğinde görülen fenotip, ATP11C eksikliğinde de ortaya çıkmıştır.

ATP11C'nin pre-BCR sinyal yolağı üzerine olan etkileri direkt olarak detaylı bir şekilde çalışılmamasına rağmen, bu tez çalışması kapsamında elde edilen bazı sonuçlar ATP11C'nin pre-BCR ekspresyonu ve/veya sinyalizasyonu üzerine bir etkisi olmama ihtimalini güçlendirmektedir. Bu çalışmada kullanılan WK3 hücrelerinin en önemli özelliklerinden biri yüksek miktardaki IL-7 varlığında sürekli olarak çoğalabilmesidir ve bu proliferasyon özelliği hücrelerin yüzeylerinde bulunan artmış pre-BCR ekspresyonundan kaynaklanmaktadır (Flemming vd., 2003). Yani artmış pre-BCR ekspresyonu bu hücrelerin IL-7'ye bağımlı proliferasyonlarını kontrol etmektedir. Dolayısıyla, eğer ATP11C'nin pre-BCR ekspresyonu ve/veya sinyalizasyonu üzerinde herhangi bir etkisi olsaydı, ATP11C-defektli pre-B hücrelerinin IL-7'ye bağımlı proliferasyonları da etkilenirdi. ATP11C-defektli WK3 pre-B hücrelerinin IL-7'ye bağımlı proliferasyonlarının etkilenmemiş olması, ATP11C'nin pre-BCR ekspresyonu ve/veya sinyal yolağı üzerine bir etkisinin olmadığı fikrini desteklemektedir. Fakat unutulmamalıdır ki bahsedilen deneylerde farklı hücre grupları kullanılmıştır. Anti-Igβ ile stimüle edilen deneylerde ATP11C-defektli fareler kullanılırken (*in vivo*), bu tez çalışmasında ise $SLP65^{-/-}$ farelerden türetilen bir pre-B hücre hattı (*in vitro*) kullanılmıştır. Ayrıca, SLP65 pre-BCR sinyal yolağında önemli bir adaptör protein olduğu için SLP65 delesyonu pre-B hücrelerinin davranışlarını etkileyebilir veya farklı özellikler kazanmasını sağlayabilir.

IL-7R ve pre-BCR sinyal yolaklarına ilave olarak, yakın zamanda yapılan bir çalışma CXCR4 sinyal yolağının erken B hücre gelişiminde önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir (Mandal vd., 2019). CXCR4 sinyal yolağı RAG1/2

upregülasyonu, pre-BCR süpresyonu ve Igκ rekombinasyonunun indüklenmesi gibi farklı moleküler mekanizmalar vasıtasıyla dinlenen küçük pre-B (resting small pre-B) hücre oluşumunu kontrol etmektedir (Mandal vd., 2019). Dolayısıyla, ATP11C-defektli farelerde gözlemlenen fenotip için diğer bir ihtimal ise ATP11C, CXCR4 sinyal yolağını etkileyerek B hücre yetmezliğine neden olabilir.

Daha önceden de bahsedildiği gibi deneylerde kullanılan WK3 hücreleri IL-7 varlığında prolifere olur fakat IL-7'siz bırakıldıklarında bir sonraki evre olan IgM^+ olgunlaşmamış B hücrelerine farklılaşırlar (Flemming vd., 2003). Dolayısıyla bu hücreler kullanılarak ATP11C'nin pre-B hücrelerinin olgunlaşmamış B hücrelerine farklılaşmaları üzerine etkisinin olup olmadığı da araştırılmıştır. İlginç bir şekilde, ATP11C-defektli WK3 pre-B hücreleri IL-7'siz bırakıldıklarında $Ig\kappa^+IgM^+$ olgunlaşmamış B hücrelerine farklılaşmada başarısız olmuşlardır. Bu sonuçlar ATP11C'nin, pre-B hücre evresinden olgunlaşmamış B hücre evresine geçişte bir rolü olabileceği fikrini ileri sürmektedir. Bu etkilerin moleküler mekanizmaları gelecekte yapılabilecek çalışmalar ile ortaya çıkarılabilecektir.

Sonuç olarak, bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, farelerin kemik iliğinde B hücre gelişimi için önemli olduğu raporlanan ATP11C'nin pre-B hücrelerindeki flipaz aktivitesi, IL-7'ye bağımlı proliferasyonları ve sonraki evreye farklılaşmalarındaki rolünü ortaya koymuştur. ATP11C-defektli bir pre-B hücre hattı kullanılarak yapılan bu çalışmada, diğer hücre gruplarına ek olarak literatürde ilk kez pre-B hücrelerindeki ATP11C eksikliğinin de defektli flipaz aktivitesine neden olduğu bulunmuştur. Diğer çalışmalar ile birlikte bu sonuçlar, ATP11C'nin immün sistem hücrelerinin plazma membranlarındaki en etkin flipaz aktivitesine sahip P4-tip ATPaz'lardan biri olduğunu kanıtlamaktadır. Ayrıca sonuçlarımız, kullanılan WK3 hücre hattında ATP11C'nin pre-B hücrelerinin IL-7'ye bağımlı proliferasyonlarını etkilemediğini fakat $Ig\kappa^+IgM^+$ olgunlaşmamış B hücrelerine farklılaşmalarını kontrol ettiğini göstermiştir. Sonuçlarımız ATP11C tarafından sağlanan membran lipit asimetrisinin erken B hücre gelişimini nasıl etkilediği konusundaki literatüre katkıda bulunmuştur. Fakat, ATP11C'nin pre-B hücrelerinde proliferasyondan farklılaşmaya geçişi nasıl kontrol ettiğini ortaya çıkarmak için gelecekte yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

Abbas A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015). *Temel İmmünoloji, İmmün sistemin İşlev ve Bozuklukları* (Çeviri Editörleri; Camcıoğlu, Y. & Deniz G). İstanbul: Güneş Tıp Kitapevleri.

Barata, J. T., Durum, S. K., & Seddon, B. (2019). Flip the coin: IL-7 and IL-7R in health and disease. *Nat Immunol, 20*(12), 1584-1593. doi:10.1038/s41590-019-0479-x

Bevers, E. M., & Williamson, P. L. (2010). Phospholipid scramblase: an update. *FEBS Lett, 584*(13), 2724-2730. doi:10.1016/j.febslet.2010.03.020

Bradl, H., & Jäck, H. M. (2001). Surrogate light chain-mediated interaction of a soluble pre-B cell receptor with adherent cell lines. *J Immunol, 167*(11), 6403-6411. doi:10.4049/jimmunol.167.11.6403

Bretscher, M. S. (1972). Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nat New Biol, 236*(61), 11-12. doi:10.1038/newbio236011a0

Cambier, J. C., Gauld, S. B., Merrell, K. T., & Vilen, B. J. (2007). B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nat Rev Immunol, 7*(8), 633-643. doi:10.1038/nri2133

Chinen, J., & Shearer, W. T. (2003). Basic and clinical immunology. *J Allergy Clin Immunol, 111*(3 Suppl), S813-818. doi:10.1067/mai.2003.154

Clark, M. R., Mandal, M., Ochiai, K., & Singh, H. (2014). Orchestrating B cell lymphopoiesis through interplay of IL-7 receptor and pre-B cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol, 14*(2), 69-80. doi:10.1038/nri3570

Corcoran, A. E., Smart, F. M., Cowling, R. J., Crompton, T., Owen, M. J., & Venkitaraman, A. R. (1996). The interleukin-7 receptor alpha chain transmits

distinct signals for proliferation and differentiation during B lymphopoiesis. *Embo J, 15*(8), 1924-1932.

Corfe, S. A., & Paige, C. J. (2012). The many roles of IL-7 in B cell development; Mediator of survival, proliferation and differentiation. *Semin Immunol, 24*(3), 198-208. doi:https://doi.org/10.1016/j.smim.2012.02.001

Daleke, D. L. (2003). Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res, 44*(2), 233-242. doi:10.1194/jlr.R200019-JLR200

Fleming, H. E., & Paige, C. J. (2001). Pre-B cell receptor signaling mediates selective response to IL-7 at the pro-B to pre-B cell transition via an ERK/MAP kinase-dependent pathway. *Immunity, 15*(4), 521-531. doi:10.1016/s1074-7613(01)00216-3

Flemming, A., Brummer, T., Reth, M., & Jumaa, H. (2003). The adaptor protein SLP-65 acts as a tumor suppressor that limits pre-B cell expansion. *Nat Immunol, 4*(1), 38-43. doi:10.1038/ni862

Gauthier, L., Rossi, B., Roux, F., Termine, E., & Schiff, C. (2002). Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. *Proc Natl Acad Sci U S A, 99*(20), 13014-13019. doi:10.1073/pnas.202323999

Gong, S., & Nussenzweig, M. C. (1996). Regulation of an early developmental checkpoint in the B cell pathway by Igβ. *Science, 272*(5260), 411-414. doi:doi:10.1126/science.272.5260.411

Goñi, F. M. (2014). The basic structure and dynamics of cell membranes: An update of the Singer–Nicolson model. *Biochim Biophys Acta - Biomembranes, 1838*(6), 1467-1476. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.006

Gordesky, S. E., & Marinetti, G. V. (1973). The asymetric arrangement of phospholipids in the human erythrocyte membrane. *Biochem Biophys Res Commun, 50*(4), 1027-1031. doi:10.1016/0006-291x(73)91509-x

Graham, T. R. (2004). Flippases and vesicle-mediated protein transport. *Trends Cell Biol, 14*(12), 670-677. doi:10.1016/j.tcb.2004.10.008

Hardy, R. R., & Hayakawa, K. (2001). B cell development pathways. *Annu Rev Immunol, 19*, 595-621. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.595

Hendriks, R. W., & Middendorp, S. (2004). The pre-BCR checkpoint as a cell-autonomous proliferation switch. *Trends Immunol, 25*(5), 249-256. doi:10.1016/j.it.2004.02.011

Herzog, S., Reth, M., & Jumaa, H. (2009). Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol, 9*(3), 195-205. doi:10.1038/nri2491

Hoffman, W., Lakkis, F. G., & Chalasani, G. (2016). B cells, antibodies, and more. *Clin J Am Soc Nephrol, 11*(1), 137-154.

Ikeda, M., Kihara, A., & Igarashi, Y. (2006). Lipid Asymmetry of the Eukaryotic Plasma Membrane: Functions and Related Enzymes. *Biol Pharm Bull, 29*(8), 1542-1546. doi:10.1248/bpb.29.1542

Inlay, M. A., Bhattacharya, D., Sahoo, D., Serwold, T., Seita, J., Karsunky, H., Plevritis, S. K., Dill, D. L. & Weissman, I. L. (2009). Ly6d marks the earliest stage of B-cell specification and identifies the branchpoint between B-cell and T-cell development. *Genes Dev, 23*(20), 2376-2381. doi:10.1101/gad.1836009

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. & Capra, D.J. (1999). New York: NY: Garland Publishing.

Jing, W., Yabas, M., Bröer, A., Coupland, L., Gardiner, E. E., Enders, A., & Bröer, S. (2019). Calpain cleaves phospholipid flippase ATP8A1 during apoptosis in platelets. *Blood Advances, 3*(3), 219-229. doi:10.1182/bloodadvances.2018023473

Kitamura, D., Kudo, A., Schaal, S., Müller, W., Melchers, F., & Rajewsky, K. (1992). A critical role of lambda 5 protein in B cell development. *Cell, 69*(5), 823-831. doi:10.1016/0092-8674(92)90293-l

Kitamura, D., Roes, J., Kühn, R., & Rajewsky, K. (1991). A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin μ chain gene. *Nature, 350*(6317), 423-426. doi:10.1038/350423a0

Lentz, B. R. (2003). Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Prog Lipid Res, 42*(5), 423-438. doi:https://doi.org/10.1016/S0163-7827(03)00025-0

Leventis, P. A., & Grinstein, S. (2010). The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu Rev Biophys, 39*, 407-427. doi:10.1146/annurev.biophys.093008.131234

Lopez-Marques, R. L., Theorin, L., Palmgren, M. G., & Pomorski, T. G. (2013). P4-ATPases: lipid flippases in cell membranes. *Pflugers Arch*. doi:10.1007/s00424-013-1363-4

Malin, S., McManus, S., Cobaleda, C., Novatchkova, M., Delogu, A., Bouillet, P., Strasserö A. & Busslinger, M. (2010). Role of STAT5 in controlling cell survival and immunoglobulin gene recombination during pro-B cell development. *Nat Immunol, 11*(2), 171-179. doi:10.1038/ni.1827

Mandal, M., Okoreeh, M. K., Kennedy, D. E., Maienschein-Cline, M., Ai, J., McLean, K. C., Kaverina, N., Veselits, M., Aifantis, I., Gounari, F. & Clark, M. R. (2019). CXCR4 signaling directs Igk recombination and the molecular mechanisms of late B lymphopoiesis. *Nat Immunol, 20*(10), 1393-1403.

Mandal, M., Powers, S. E., Ochiai, K., Georgopoulos, K., Kee, B. L., Singh, H., & Clark, M. R. (2009). Ras orchestrates exit from the cell cycle and light-chain recombination during early B cell development. *Nat Immunol, 10*(10), 1110-1117. doi:10.1038/ni.1785

Minegishi, Y., Coustan-Smith, E., Wang, Y. H., Cooper, M. D., Campana, D., & Conley, M. E. (1998). Mutations in the human lambda5/14.1 gene result in B cell deficiency and agammaglobulinemia. *J Exp Med, 187*(1), 71-77. doi:10.1084/jem.187.1.71

Montigny, C., Lyons, J., Champeil, P., Nissen, P., & Lenoir, G. (2016). On the molecular mechanism of flippase- and scramblase-mediated phospholipid transport. *Biochim Biophys Acta, 1861*(8 Pt B), 767-783. doi:10.1016/j.bbalip.2015.12.020

Mundt, C., Licence, S., Shimizu, T., Melchers, F., & Mårtensson, I. L. (2001). Loss of precursor B cell expansion but not allelic exclusion in VpreB1/VpreB2 double-deficient mice. *J Exp Med, 193*(4), 435-445. doi:10.1084/jem.193.4.435

Nakanishi, H., Irie, K., Segawa, K., Hasegawa, K., Fujiyoshi, Y., Nagata, S., & Abe, K. (2020). Crystal structure of a human plasma membrane phospholipid flippase. *J Biol Chem, 295*(30), 10180-10194. doi:10.1074/jbc.RA120.014144

Nicolson, G. L. (2014). The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim Biophys Acta, 1838*(6), 1451-1466. doi:10.1016/j.bbamem.2013.10.019

Nosaka, T., van Deursen, J. M. A., Tripp, R. A., Thierfelder, W. E., Witthuhn, B. A., McMickle, A. P., Doherty, P. C., Grosveld, G. C. & Ihle, J. N. (1995). Defective Lymphoid Development in Mice Lacking Jak3. *Science, 270*(5237), 800-802. doi:doi:10.1126/science.270.5237.800

Nutt, S. L., & Kee, B. L. (2007). The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity, 26*(6), 715-725. doi:10.1016/j.immuni.2007.05.010

Ohnishi, K., & Melchers, F. (2003). The nonimmunoglobulin portion of lambda5 mediates cell-autonomous pre-B cell receptor signaling. *Nat Immunol, 4*(9), 849-856. doi:10.1038/ni959

Özdemirli, S. (2010). *B hücreli akut lenfoblastik lösemilerde pax5 geninin araştırılması.* (Yayımlanmamış yüksek lisans tezi). İstanbul Üniversitesi, İstanbul.

Pelanda, R., Braun, U., Hobeika, E., Nussenzweig, M. C., & Reth, M. (2002). B cell progenitors are arrested in maturation but have intact VDJ recombination in the absence of Ig-alpha and Ig-beta. *J Immunol, 169*(2), 865-872. doi:10.4049/jimmunol.169.2.865

Peschon, J. J., Morrissey, P. J., Grabstein, K. H., Ramsdell, F. J., Maraskovsky, E., Gliniak, B. C., Park, L. S., Ziegler, S. F., Williams, D. E., Ware, C. B., Meyer, J. D & Davison, B. L. (1994). Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med, 180*(5), 1955-1960. doi:10.1084/jem.180.5.1955

Pomorski, T., Hrafnsdóttir, S., Devaux, P. F., & van Meer, G. (2001). Lipid distribution and transport across cellular membranes. *Semin Cell Dev Biol, 12*(2), 139-148. doi:10.1006/scdb.2000.0231

Pomorski, T. G., & Menon, A. K. (2016). Lipid somersaults: Uncovering the mechanisms of protein-mediated lipid flipping. *Prog Lipid Res, 64*, 69-84. doi:https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.08.003

Puel, A., Ziegler, S. F., Buckley, R. H., & Leonard, W. J. (1998). Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nat Genet, 20*(4), 394-397. doi:10.1038/3877

Quah, B. J. C., & Parish, C. R. (2012). New and improved methods for measuring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo using CFSE-like fluorescent dyes. *J Immunol Methods, 379*(1), 1-14. doi:https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.02.012

Reth, M., & Nielsen, P. (2014). Signaling circuits in early B-cell development. *Adv Immunol, 122*, 129-175. doi:10.1016/b978-0-12-800267-4.00004-3

Rolink, A. G., Winkler, T., Melchers, F., & Andersson, J. (2000). Precursor B cell receptor-dependent B cell proliferation and differentiation does not require the bone marrow or fetal liver environment. *J Exp Med, 191*(1), 23-32. doi:10.1084/jem.191.1.23

Segawa, K., Kurata, S., Yanagihashi, Y., Brummelkamp, T. R., Matsuda, F., & Nagata, S. (2014). Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. *Science, 344*(6188), 1164-1168. doi:10.1126/science.1252809

Segawa, K., Yanagihashi, Y., Yamada, K., Suzuki, C., Uchiyama, Y., & Nagata, S. (2018). Phospholipid flippases enable precursor B cells to flee engulfment by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A, 115*(48), 12212-12217. doi:doi:10.1073/pnas.1814323115

Shin, H.-W., & Takatsu, H. (2022). Regulatory Roles of N- and C-Terminal Cytoplasmic Regions of P4-ATPases. *Chem Pharm Bull, 70*(8), 524-532. doi:10.1248/cpb.c22-00042

Siggs, O. M., Arnold, C. N., Huber, C., Pirie, E., Xia, Y., Lin, P., Nemazee, D. & Beutler, B. (2011). The P4-type ATPase ATP11C is essential for B lymphopoiesis in adult bone marrow. *Nat Immunol, 12*(5), 434-440. doi:10.1038/ni.2012

Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science, 175*(4023), 720-731. doi:doi:10.1126/science.175.4023.720

Takatsu, H., Takayama, M., Naito, T., Takada, N., Tsumagari, K., Ishihama, Y., Nakayama, K. & Shin, H.-W. (2017). Phospholipid flippase ATP11C is

endocytosed and downregulated following Ca2+-mediated protein kinase C activation. *Nat Commun, 8*(1), 1423. doi:10.1038/s41467-017-01338-1

Takatsu, H., Tanaka, G., Segawa, K., Suzuki, J., Nagata, S., Nakayama, K., & Shin, H. W. (2014). Phospholipid flippase activities and substrate specificities of human type IV P-type ATPases localized to the plasma membrane. *J Biol Chem, 289*(48), 33543-33556. doi:10.1074/jbc.M114.593012

Thomis, D. C., Gurniak, C. B., Tivol, E., Sharpe, A. H., & Berg, L. J. (1995). Defects in B Lymphocyte Maturation and T Lymphocyte Activation in Mice Lacking Jak3. *Science, 270*(5237), 794-797. doi:doi:10.1126/science.270.5237.794

Torres, R. M., Flaswinkel, H., Reth, M., & Rajewsky, K. (1996). Aberrant B cell development and immune response in mice with a compromised BCR complex. *Science, 272*(5269), 1804-1808. doi:10.1126/science.272.5269.1804

van der Mark, V. A., Elferink, R. P., & Paulusma, C. C. (2013). P4 ATPases: flippases in health and disease. *Int J Mol Sci, 14*(4), 7897-7922. doi:10.3390/ijms14047897

Verkleij, A. J., Zwaal, R. F., Roelofsen, B., Comfurius, P., Kastelijn, D., & van Deenen, L. L. (1973). The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim Biophys Acta, 323*(2), 178-193. doi:10.1016/0005-2736(73)90143-0

von Freeden-Jeffry, U., Vieira, P., Lucian, L. A., McNeil, T., Burdach, S. E., & Murray, R. (1995). Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med, 181*(4), 1519-1526. doi:10.1084/jem.181.4.1519

Yabas, M., Coupland, L. A., Cromer, D., Winterberg, M., Teoh, N. C., D'Rozario, J., Kirk, K., Broer, S., Parish, C. R. & Enders, A. (2014). Mice deficient in the putative phospholipid flippase ATP11C exhibit altered erythrocyte shape, anemia, and reduced erythrocyte life span. *J Biol Chem, 289*(28), 19531-19537. doi:10.1074/jbc.C114.570267

Yabas, M. (2014). *B cell deficiency and anaemia caused by mutations in the murine Atp11c gene*. (Yayımlanmamış doktora tezi). The Australia National University, Canberra, Australia

Yabas, M., Jing, W., Shafik, S., Bröer, S., & Enders, A. (2016). ATP11C Facilitates Phospholipid Translocation across the Plasma Membrane of All Leukocytes. *PLoS One, 11*(1), e0146774. doi:10.1371/journal.pone.0146774

Yabas, M., Teh, C. E., Frankenreiter, S., Lal, D., Roots, C. M., Whittle, B., Andres, D. T., Zhang, Y., Teoh, N. T., Sprent, J., Tze, L. E., Kucharska, E. M., Kofler, J., Farell, G. C., Broer, S., Goodnow, C. C. & Enders, A. (2011). ATP11C is critical for the internalization of phosphatidylserine and differentiation of B lymphocytes. *Nat Immunol, 12*(5), 441-449. doi:10.1038/ni.2011

Yao, J., Wang, L., Chen, L., Zhang, S., Zhao, Q., Jia, W., & Xue, J. (2006). Cloning and developmental expression of the DEC1 ortholog gene in zebrafish. *Gene Expr Patterns, 6*(8), 919-927. doi:10.1016/j.modgep.2006.03.006

Zehentmeier, S., & Pereira, J. P. (2019). Cell circuits and niches controlling B cell development. *Immunol Rev, 289*(1), 142-157. doi:10.1111/imr.12749

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı: Seda ARAL
Doğum Yeri ve Tarihi: Bursa-1995
E-mail: aaralsedaa@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı (2019-devam ediyor).
Lisans	Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Hemşirelik Bölümü (2014-2018).

İŞ DENEYİMLERİ

2020-Halen	Bursa Şehir Hastanesi
2019-2020	Amerikan Hastanesi
2018-2019	Acıbadem Hastanesi

STAJ BİLGİLERİ

2018	• Trakya Üniversitesi SUAM Madde ve Diğer Bağımlılıklardan Kurtulma Merkezi & Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği

2017	• Trakya Üniversitesi SUAM Halk Sağlığı Merkezi & Ev ziyaretleri ile Kadın Çocuk Gebe Sağlığı Değerlendirme ve Sağlık Ocağı işleyişi
2016	• Trakya Üniversitesi SUAM Çocuk Hematoloji ve Onkoloji Kliniği, Çocuk Yoğun Bakım Ünitesi Kadın Hastalıkları Kliniği & Kadın Doğum Kliniği • Uludağ Üniversitesi SUAM Çocuk Hastalıkları Kliniği & Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği (Doğumhane)
2015	• Trakya Üniversitesi SUAM Nöroşirurji Kliniği,Genel Cerrahi Kliniği,Kalp Damar Cerrahisi Yoğun Bakımı,Yetişkin Acil Endokrinoloji Kliniği,Genel Dahiliye Kliniği, Dahiliye Yoğun Bakımı,Göğüs Hastalıkları Kliniği • Uludağ Üniversitesi.SUAM Genel Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi, Onkoloji Kliniği
2014	• Trakya Üniversitesi SUAM -Radyasyon Onkolojisi Kliniği • Uludağ Üniversitesi SUAM-Nefroloji Kliniği

BİLİMSEL ÇALIŞMALAR

1. Ünver S, Güray Ö, Aral S. (2021) "The Effects of The Game Intervention on Postoperative Anxiety and Pain Levels in Children: A Randomized Controlled Study". J Pediatr Res 2021; 8(2): 116-123.
2. Ünver S, Özlem G, Aral S. (2020) "Effectiveness of a Group Game Intervention in Reducing Preoperative Anxiety Levels of Children and Parents: A Randomized Controlled Trial" AORN Journal. Volume: 111, Issue: 4, Page: 403-412.
3. Ünver S, Özkan ZK, Semerci R, Avcıbaşı I.M, Aral S. "Rational Analgesic Use Status of Nursing Students". 20th International Nursing Research Conference, Coruna-Spain, 15-18 November, 2016 (Oral Presentation).